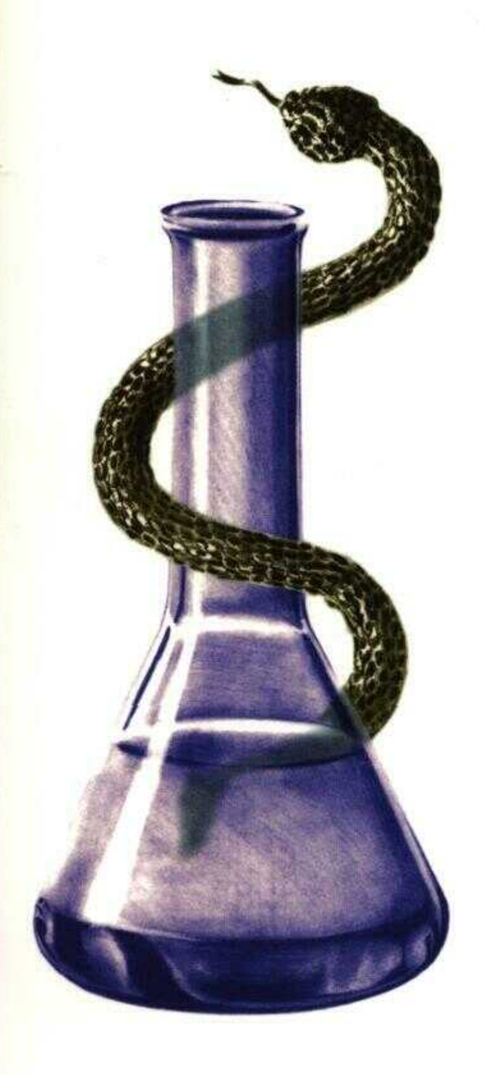
Biochimie clinique

coordonnateur
Pierre Valdiguié

2e édition





Biochimie clinique

Dans la même collection

Immunologie
N. Genetet, coord., 3e édition, 1997

Hématologie
R. Fauchet, N. Ifrah, coord., 2e édition, 1995

Allergologie et immunologie clinique
A.Sabbah, 1994

Virologie médicale
R. Crainic, J.-C. Nicolas, coord., 1993

Chez le même éditeur

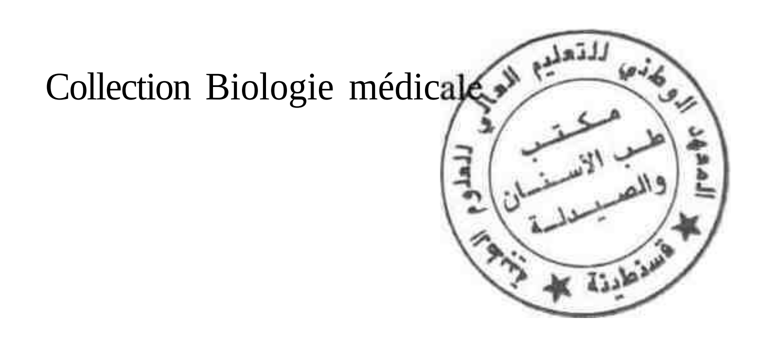
Le technicien d'analyses biologiques : guide théorique et pratique
J. Béraud, coord., 2000

Le magnésium en biologie et en médecine
î. Durlach, M. Bara, 2e édition, 2000

Aide-mémoire de biochimie et de biologie moléculaire
F. Widmer, R. Beffa, 2e édition, 2000

Les mitochondries : biologie et incidences physiopathologiques
C. Delbart, 2000

L'assurance qualité dans les laboratoires agroalimentaires et pharmaceutiques
M. Feinberg, coord., 1999



Biochimie clinique

2e édition

COORDONNATEUR

Pierre Valdiguié

professeur de biochimie médicale à l'université Paul-Sabatier de Toulouse,
faculté de médecine de Rangueil,
médecin biologiste des hôpitaux de Toulouse, chef de service de biochimie
hôpital universitaire de Rangueil,
médecin rhumatologue



Allée de la Croix Bossée
F-94234 Cachan cedex

COORDONNATEUR

Pierre Valdiguié

professeur de biochimie médicale à l'université Paul-Sabatier de Toulouse, faculté de médecine de Rangueil, médecin biologiste des hôpitaux de Toulouse, chef de service de biochimie, à l'hôpital universitaire de Rangueil, médecin rhumatologue

AUTEURS

France de la Farge
Docteur en pharmacie

Marie-Laure Solera
Docteur en pharmacie

Michel Lagente
Docteur en médecine

Jacques de Graeve
Docteur en médecine

Maîtres de conférences à l'université Paul-Sabatier de Toulouse, faculté de médecine de Rangueil.
*Praticiens hospitaliers, biologistes **des** Hôpitaux de Toulouse, hôpital universitaire de **Rangueil, service de** biochimie.*

Thierry Levade
Docteur en médecine. Directeur de recherches Inserm.

AVEC LA COLLABORATION DE

Eve Duplantier
Secrétaire médicale

Danièle Dominguez
Secrétaire médicale



Introduction

Pierre Valdiguié

La chimie des urines puis du sang et des humeurs a été pendant longtemps la seule discipline de la « biologie médicale ». L'hématologie, la microbiologie, l'immunologie se sont ensuite fortement développées et se regroupent souvent maintenant au côté de la biochimie, dans le cadre moderne de la biologie moléculaire. La biochimie clinique associe la chimie physiologique, la chimie séméiologique et la biologie moléculaire.

Nous décrirons seulement les deux premières dans cet ouvrage en les associant d'ailleurs dans chaque chapitre pour illustrer au mieux, après des rappels fondamentaux de physiologie, de physicochimie ou de biochimie métabolique, les méthodes d'exploration utilisées au « laboratoire d'analyses médicales » et les variations observées chez l'individu malade.

En effet la médecine moderne s'appuie de plus en plus sur les examens paracliniques d'imagerie (radiographie et tomographie traditionnelles, tomodensitographie informatisée ou « scanner », échographie ultrasonore et imagerie par résonance magnétique) et de biologie multidisciplinaire.

1 Cet ouvrage doit donc être considéré comme un livre de séméiologie médicale, où de nombreux paramètres biologiques sont décrits, pour tous lesquels le lecteur n'est pas nécessairement familiarisé. Il peut toutefois servir aussi de complément d'approche clinique au lecteur issu d'autres formations que la médecine ou la pharmacie.

Table des matières

Chapitre 2

Équilibre acidobasique — 31

Chapitre 3

Métabolisme phosphocalcique ———————————— 61

Chapitre 4

Métabolisme du fer ——— 99

Chapitre 5

Métabolisme du magnésium, du cuivre et du lithium ——— 119

Chapitre 6

Chapitre 7

Métabolisme des lipides et des lipoprotéines —— 161

Chapitre 8

Généralités sur le métabolisme azoté — 187

Chapitre 9

Protéines plasmatiques — 197

Chapitre 10

Enzymes plasmatiques — 235

1

Chapitre ***11***

Chapitre 12

Chapitre 13

Chapitre 14

Éléments d'organisation du laboratoire — 317

1

Equilibre hydroélectrolytique

Pierre Valdiguié

L'eau représente, de très loin, le constituant le plus abondant de notre organisme : 55 à 70 % du poids du corps. Elle participe par ses molécules autant que par ses ions OH^- et H⁴" à tous les échanges et à de très nombreuses réactions, Son métabolisme et son étude ne peuvent être dissociés de ceux des électrolytes, en particulier le sodium (Na) et le chlore (Cl).

V

I. *Rappels physiologiques et physicochimiques*

.1. Bilan de l'eau et des substances minérales

[U. *Teneur des organismes en eau et sels minéraux*

.1.1.1. Teneur en eau

Elle varie :

- suivant l'âge (nourrisson 75 %, vieillard 60 %), par extension du tissu fibreux ;
- suivant l'adiposité, le tissu adipeux étant très pauvre en eau ;
- suivant les tissus, les tissus mous et les muscles en particulier étant, bien sûr, beaucoup plus riches que le tissu osseux (20 à 25 %) (tableau 1.1).

1.1.1.2. Teneur en sels minéraux

La teneur en Na^+ et Cl" est identique : 0,08 % du poids du corps soit environ 3 500 à 4 300 mmol pour chacun.

Le K représente 0,2 %, soit 3600 mmol.

Tableau 1 • Teneur en eau de quelques tissus

Sang total	79%
Plasma	89-90%
Rein	79-83 %
Cerveau	75-82 %
Muscle	73-76 %
Poumon	79%
Foie	70%
Squelette	20-30%
Tissu adipeux	15-20 %

En moyenne l'eau représente 55 à 60 % du poids du corps chez l'adulte.

7.7.2. *Besoins en eau et en sels*

L'apport quotidien d'une certaine quantité d'eau est indispensable à la vie. Les besoins sont évalués en fonction de l'élimination qui varie elle-même en fonction des conditions extérieures, ou des conditions pathologiques.

Le besoin moyen d'eau chez l'adulte est de 2 litres/24 heures, soit 30 ml/kg environ.

Il est beaucoup plus élevé chez l'enfant :
- 180 ml/kg pour le nouveau-né ;
- 125 ml/kg à 6 mois ;
- 100 ml/kg à 1 an.

Les besoins en sels sont de l'ordre de :
- 4 à 6 g/24 h pour le sodium et les chlorures ;
- 3 à 4 g/24 h pour le potassium.

1.1.3. Apports

1.1.3.1. Apports d'eau

Ils sont endogènes et exogènes.

L'apport endogène naît de réactions métaboliques de déshydratation de substrats divers et surtout des réactions d'oxydation au cours de la respiration cellulaire. Ainsi environ 300 ml d'eau sont fournis.

L'apport exogène est obligatoire (environ 2 000 ml/24 h) sous forme d'eau de boisson (500 à 1 000 ml) et sous forme d'aliments solides (800 à 1 200 ml).

1.1.3.2. *Apports de sel*

Outre le sel utilisé pour la cuisson et l'assaisonnement, l'eau potable apporte :
- des sels minéraux alcalins (NaCl, KC1) ;
- des sels alcalinoterreux (bicarbonates de Ça et Mg) ;
- de l'iode sous forme d'iodures.

Les végétaux, les fruits, le lait apportent aussi de nombreux anions et cations.

En pratique, l'alimentation normale apporte suffisamment de sel (9 à 15 g/24 h) et il ne serait pas nécessaire de saler nos aliments. Cet apport correspond à une charge osmolaire d'environ 800 mOsm. Certains aliments sont cependant pauvres en NaCl, comme le riz, et ils seront utilisés dans les régimes désodés.

1.1.4. États de l'eau dans l'organisme

n faut différencier d'une part :

- *l'eau libre ou eau solvant* comprenant l'eau de circulation du sang et des humeurs, eau de transport pour les substances du métabolisme, pour les calories, l'eau lacunaire des liquides interstitiels, des séreuses qui est une eau de soutien, de reserve et d'échange ;
- *l'eau liée ou eau de combinaison*, faisant partie intégrante du protoplasme encore appelée eau d'« imbibition des gels », analogue à l'eau de cristallisation d'un corps cristallisable (CuS04, 5 H_2O), par exemple. Cette eau résiste à la congélation et représente environ 10 % du poids du corps.

7.7.5. *Rôles de l'eau*

Ils sont très nombreux, associant :

- *rôle mécanique de transport* de calories et de substances variées, de protection dans le cas du LCR ou de l'amnios, *de glissement et de lubrification* pour la plèvre, le péricarde ou les articulations ;
- *rôle chimique* pour les réactions d'hydrolyse, d'hydratation ou d'oxydoréduction par ses ions $H^{1''}$;
- *rôle physique* enfin par ses ions qui participent au maintien de l'équilibre acidobasique et par ses molécules (eau solvant). Ainsi, on peut grossièrement considérer le plasma sanguin comme une solution aqueuse glucosée de sels minéraux et de protéines.

1.1.6. Elimination de l'eau et des sels minéraux

1.1.6.1. Élimination digestive

Elle est faible (100 à 200 ml/jour) du fait de la réabsorption intestinale, alors que près de 8 1 sont déversés chaque jour dans la lumière intestinale par les diverses sécrétions. Les laxatifs salins augmentent l'eau fécale par appel osmotique, les laxatifs huileux s'opposent à la réabsorption en créant un film lipidique entre la muqueuse et le contenu colique.

1.1.6.2. Elimination pulmonaire et cutanée

La perspiration pulmonaire représente l'eau qui sature l'air expiré. Elle est proportionnelle à la ventilation pulmonaire.

La perspiration cutanée est l'élimination **permanente d'eau par évaporation à** la surface du corps, indépendamment de la sueur.

Le tout constitue **la perte insensible d'eau, évaluée à environ 800 ml/jour.**

Ces conditions basales peuvent être largement perturbées par :

- la sudation, qui peut entraîner une spoliation importante de sels et d'eau ;
- la fièvre à 38° **C,** provoquant une perte d'environ 1 200 à 1 400 ml ;
- la fièvre à 40 °C, environ 1 600 ml ;
- la fièvre avec polypnée, 1 800 ml ;
- la fièvre avec sueur et polypnée, 2 000 ml.

Ces valeurs devront être prises en considération lors de la réanimation et de l'équilibration des patients.

1.1.6.3. *Élimination urinaire*

Elle est, pour l'eau, de 1 200 à 1 500 ml/24h du fait de la filtration glomérulaire, de la résorbption tubulaire passive, liée à la réabsorption saline, et active par l'hormone antidiurétique au niveau du **tube distal et du tube collecteur, qui constituent le site essentiel du contrôle de l'élimination de l'eau.**

Quant à l'élimination minérale urinaire, elle est sous la dépendance de la cortico-surrénale et de l'activité de certaines enzymes comme l'anhydrase carbonique (activité diurétique des inhibiteurs de cette enzyme) qui participe par ailleurs à l'équilibre acidobasique (cf. chapitre suivant).

- *Le* Na^+ entièrement filtré au niveau du glomérule est réabsorbé obligatoirement pour 80 à 85 % dans le tube proximal. Cette réabsorption active entraîne l'absorption passive d'eau et de chlorures, ce qui aboutit à une urine isotonique à l'entrée de l'anse de Henlé.

Le long de la branche descendante de l'anse, il y a concentration progressive de l'urine en face du tissu médullaire hypertonique (gradient osmotique cortico-papillaire). Le long de la branche ascendante, il y a au contraire dilution progressive de l'urine qui est hypotonique à l'entrée du tube distal.

Dans celui-ci, 10 % environ du **Na^+** peuvent encore être réabsorbés en échange avec $H^{4'}$ et **K^+**, sous l'influence de l'aldostérone. Dans le tube collecteur enfin, l'ajustement terminal hormonodépendant aboutit à des urines hyper- ou hypotoniques.

Finalement la natrurie est éminemment variable, dépendant principalement de l'apport alimentaire, oscillant donc entre 5 et 400 mmol/24 h.

- *Pour le potassium*, l'élimination est urinaire et digestive, également fonction de l'apport exogène. Une ration alimentaire normale apporte 50 à 100 mmol /24h de $K^{''1'}$ dont 45 à 90 sont éliminées dans les urines ; les 5 à 10 mmol restantes sont retrouvées dans les selles.

- *Au total,* l'osmolalité maximale de l'urine ne pourra dépasser 1 200 mOsm/1.

Unités employées

Ce sont essentiellement les millimoles, les milliéquivalents, les milliosmoles.

Millimole (mmol/l ou mM)

C'est le rapport du poids en mg sur le poids moléculaire. Ainsi une millimole représente le millième de la masse de 6,02 x 10^{23} atomes ou molécules.

t
• ***MUliéquivalent (mEq)***

f C'est le rapport en mg x valence sur le poids moléculaire ou atomique. Ainsi pour les ions monovalents, comme Na^+ ou Cl", mmol et mEq sont identiques. Pour apprécier les concentrations, le litre est utilisé, dans le système d'unités internationales SI, et les concentrations de Na'1" plasmatique seront, par exemple, ainsi exprimées :

p Na+ = 138 mmol/l ou 138 mM ou 138 mEq/1

Le mEq est en fait une masse définie par la quantité d'électricité qu'elle transporte et cette unité ne sera utilisée que pour les électrolytes où les charges + et - se combineront entre elles, afin que les liquides biologiques soient électriquement neutres.

i • ***Milliosmole (mOsm)***

Une osmole est la pression osmotique exercée par une molécule-gramme, quelle que soit sa nature chimique, dissoute dans 1 litre d'eau (osmolarité) ou dans 1 kilogramme de solvant (osmolalité). La mOsm (10^{-3} Osm) est aussi le millième de la masse qui, dissoute dans 1 kg de plasma, est capable d'abaisser son point de congélation de 1,86 °C. À titre d'exemple, pour obtenir du soluté salé physiologique à 9 g/1 de NaCl, soit 300 mOsm/1, il faut dissoudre 161,5 mmol de NaCl dans 1 litre d'eau et non 150 mmol car le facteur de dissociation théorique de 2 devient, à ces concentrations, 1,856.

Ces notions sont capitales car elles expriment la tonicité des liquides biologiques ou des solutés injectables à usage thérapeutique, qui seront iso-, hyper- ou hypotoniques.

1.3. Répartition de l'eau et des sels — Grands compartiments liquidiens

L'eau, ignorant les barrières cellulaires, est l'objet d'échanges incessants entre les cellules et les milieux extracellulaires. L'état des liquides de l'organisme est régi par les règles fondamentales suivantes :

- ils sont isotoniques, c'est-à-dire que le rapport eau/électrolytes est constant ;

- ils possèdent une neutralité électrique, c'est-à-dire autant d'anions que de cations.

1.3.1. Compartiment extracellulaire

Le compartiment extracellulaire représente 20 % du poids du corps chez l'adulte, 40 % chez le nourrisson. Il est composé des compartiments plasmatique (5 %) et interstitiel (15 %).

1.3.1.1. Compartiment plasmatique

Outre ses 5 % deau, ce compartiment renferme de nombreuses substances dissoutes (glucose, urée, créatinine etc.) et des électrolytes, cations et anions.

► CATIONS PLASMATIQUES

Le plus important est le sodium Na^{+} (138 à 145 mmol/1 ou mEq/1). Il est le principal cation extracellulaire et il est le reflet de l'électrolytémie totale, et de la pression osmotique efficace du plasma. De plus, la natrémie participe à **la** régulation de l'équilibre acidobasique (le Na étant un élément alcalin) aux mouvements de l'eau et sa détermination en biologie clinique occupe une place fondamentale.

Le potassium K^{+} (4,5 à 5 mmol/1 ou mEq/1) est le principal cation intracellulaire, ce qui explique sa concentration basse dans le plasma.

Le calcium Ca^{++} est présent au taux de 2,3 à 2,5 mmol/1 soit 4,7 à 5 mEq/1.

Le magnésium Mg^{++} enfin, principal cation intracellulaire, représente 1 à 1,2 mmol/1 soit 2 à 2,5 mEq/1.

> ANIONS PLASMATIQUES

Le chlorure Cl^{-} est le principal anion des liquides extracellulaires. Son taux est de 98 à 103 mmol/1 ou mEq/1. En raison de ses affinités avec l'ion sodium, leurs métabolismes sont le plus souvent liés.

Le bicarbonate CO_3H^{-} exprime l'ancienne « réserve alcaline ». Sa concentration normale est de 26 à 28 mmol/1 ou mEq/1.

Les protéines sont, au pH du plasma, ionisées sous forme de protéinates, $R\text{-}COO^{-}$, et peuvent donc intervenir comme anions. Leur taux est de 65 à 75 g/1 et peut être artificiellement converti en mEq/1 grâce à un facteur multiplicatif de 0,243. Une valeur moyenne de 66 g/1 correspond donc à 16 mEq/1.

Les acides organiques, issus du métabolisme intermédiaire, (pyruvate, lactate, oxaloacétate, oxoglutarate...) représentent environ 6 mEq/1.

Phosphates et sulfates forment environ 3 mEq/1.

L'ensemble des cations (155 mEq/1) et des anions (155 mEq/1) est représenté par le schéma classique des colonnes équilibrées ci-dessous :

Tableau 1.2 • Composition électrolytique du plasma exprimée en mEq/1.

Na	143	Cl	103
K	4,5	CO_3H	27
Ça	5	Protéins	16
Mg	2,5	Acides organiques	6
		Phosphates	2
		Sulfates	1
Total	155	Total	155

Le compartiment plasmatique communique avec l'extérieur grâce aux échanges digestifs, pulmonaires, rénaux et cutanés.

1.3.1.2. Compartiment interstitiel

II est en équilibre avec le compartiment plasmatique au travers de la paroi des capillaires et avec le compartiment intracellulaire au travers des membranes cellulaires.

Sa composition est grossièrement celle d'un ultrafiltrat plasmatique, c'est-à-dire que seules les protéines sont absentes et remplacées par des chlorures. Le sodium est discrètement diminué (135 mmol/1) en raison de l'équilibre de Donnan.

1.3.2. Compartiment intracellulaire

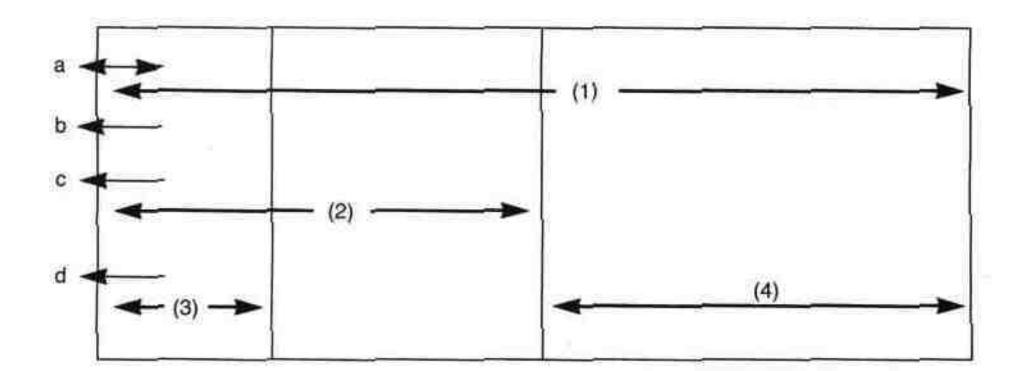
L'eau intracellulaire compte pour 35 à 40 % du poids du corps et 55 à 60 % de l'eau totale de notre organisme.

Son osmolalité est identique à celle du compartiment extracellulaire mais la nature des substances dissoutes est différente.

Le principal cation est le **potassium,** libre ou lié aux protéines cellulaires. Il participe activement à la contraction musculaire, à la transmission de l'influx nerveux et, d'une manière générale à tous les potentiels de membrane.

Le **magnésium** vient en deuxième place pour les cations cellulaires.

Les anions sont essentiellement des **phosphates** et des **protéinates.**



(1) Eau totale : environ 60 % du poids du corps
(2) Compartiment extracellulaire : environ 20 % du poids du corps
(3) Compartiment plasmatique : environ 5 % du poids du corps
(2-3) Compartiment interstitiel : environ 15 % du poids du corps
(4) Compartiment intracellulaire : environ 40 % du poids du corps

Figure 1.1 • Les grands compartiments liquidiens de l'organisme.
(a) Tube digestif, b) Peau, c) Poumon, d) Rein.

1.4. Échanges d'eau et d'électrolytes

1.4.1. Mécanisme des échanges

Ils se font par le jeu des phénomènes osmotiques.

1.4.1.1. Mouvements d'eau

L'eau diffuse librement à travers la membrane cellulaire et la paroi des capillaires en obéissant aux lois de l'osmose. Les principaux responsables de l'osmolalité sont le Na et le Cl, les bicarbonates qui, à eux trois, exercent 85 % de la pression osmotique totale.

Dans le lit vasculaire, les protéines du fait de leur taux élevé exercent une pression osmolaire importante, dénommée pression oncotique. Les mucopolyosides des espaces interstitiels, plus ou moins polymérisés, jouent également un rôle.

Les mouvements de l'eau sont simples : elle se déplace toujours du milieu le moins concentré vers celui qui est le plus concentré, ayant une osmolalité supérieure qui attire l'eau.

1.4.1.2. Mouvements et échanges de sels

Le passage des électrolytes salins au travers de la membrane cellulaire se fait soit par diffusion passive, soit par transport actif.

a) *La diffusion* obéit aux règles de l'équilibre de Donnan, créé lorsque deux solutions différentes sont séparées par une membrane perméable. L'équilibre

sera atteint lorsque les concentrations en ions diffusibles seront égales de part et d'autre de la membrane.

Début

Secteur 1		Secteur 2	
Na^+	7,5 mEq	Na^+	7,5 mEq
RCOO-	7,5 mEq	Cl-	7,5 mEq

Fin

Secteur 1		Secteur 2	
Na^+	10 mEq	Na^+	5 mEq
Cl-	2,5 mEq	Cl-	5 mEq
RCOOr	*7,5* mEq		

Figure 1.2 • Exemple de diffusion selon l'équilibre de Donnan

b) *Le transport membranaire actif* **affecte** essentiellement le sodium qui doit être rejeté hors du compartiment intracellulaire par le mécanisme de la pompe à sodium (10 à 15 mmol/1 de Na^+ contre 70 à 150 mmol/1 de K^+). Ce transfert actif consomme de l'énergie, luttant contre un gradient de concentration, et échange le plus souvent 3 Na^+ contre 2 ions K^+ et un proton H^+. Ceci explique la polarisation membranaire et les relations avec l'équilibre acidobasique, toute acidose entraînant une élévation du K^+ extracellulaire.

1.4.2. Régulation des échanges

La régulation de l'hydratation du compartiment extracellulaire est sous la dépendance du bilan du sodium, dont les modifications s'accompagneront de modifications parallèles du bilan hydrique.

La constance de l'osmolalité l'emporte en effet sur celle des volumes.

La régulation de l'hydratation du compartiment intracellulaire est sous la dépendance de l'osmolalité des liquides extracellulaires. On comprend dès lors l'importance du système neuro-hormonal complexe, agissant essentiellement sur l'élimination de l'eau et du sodium, chargé de réguler surtout le bilan sodé.

1.4.2.1. Hormone antidiurétique

L'hormone antidiurétique, ou ADH, est la vasopressine, sécrétée au niveau des noyaux hypothalamiques, déversée dans le tronc porte hypothalamo-hypophysaire et stockée dans la post-hypophyse. Toute lésion de cet axe se traduira par un diabète insipide. Elle contrôle en effet la réabsorption d'eau au niveau des tubes contourné distal et collecteur du néphron, assurant une élimination plus ou moins grande d'eau libre par les reins, en réponse à des variations de l'osmolalité plasmatique ou du volume circulant.

1.4.2.2. Régulation de l'excrétion rénale du sodium

▶ FACTEURS HÉMODYNAMIQUES — FILTRATION GLOMÉRULAIRE

La filtration, et donc la réabsorption obligatoire du sodium, dépendent évidemment du flux sanguin rénal et de la pression de perfusion artérielle rénale. En particulier doivent être soulignés le rôle de la pression dans les capillaires péritubulaires vis-à-vis de la réabsorption sodée et celui de la pression dans l'artériole afférente du glomérule qui participe à la mise en jeu du système rénine-angiotensine.

▶ SYSTÈME RÉNINE-ANGIOTENSINE ET ALDOSTÉRONE

C'est le mécanisme essentiel de régulation du bilan sodique qui agit selon deux mécanismes :

- réabsorption **tubulaire** proximale grâce à l'angiotensine qui modifie **la** vasomotricité de l'artériole afférente du glomérule ;
- reabsorption tubulaire distale grâce à l'aldostérone. Celle-ci est sécrétée par la zone glomérulée du cortex surrénal sous l'influence de facteurs multiples parmi lesquels la kaliémie, la natrémie, la concentration plasmatique d'ACTH et enfin **l'angiotensine.** Cette dernière est issue de l'hydrolyse d'une protéine plasmatique, l'angiotensinogène, par une enzyme protéolytique, la **rénine,** produite par l'appareil juxtaglomérulaire.

Parmi tous les facteurs intervenant dans la mise enjeu de la rénine, citons :

- *des stimuli :* l'hypovolémie, la baisse de pression dans l'artériole afférente, l'élévation du Na^+ dans l'urine tubulaire, absorbé par la macula densa, l'orthostatisme ;
- *une inhibition :* l'expansion des volumes extracellulaires.

>• AUTRES HORMONES

Les hormones thyroïdiennes interviennent faiblement en augmentant l'élimination d'eau cutanée et urinaire, par stimulation de la filtration glomérulaire et diminution de la réabsorption tubulaire. La carence hormonale du myxœdème s'accompagne d'ailleurs d'une infiltration cutanée d'eau et de mucopolyosides.

Les catécholamines augmentent la pression artérielle, donc la filtration glomérulaire et donc la diurèse.

Les stéroïdes interviennent surtout par le cortisol exerçant un faible effet de rétention sodée (nécessitant cependant de mettre au régime sans sel les malades sous corticothérapie au long cours) et par les œstrogènes qui produisent une rétention hydrosodée dans la deuxième partie du cycle, surtout en cas de déficit progestéronique (syndrome prémenstruel).

2. Exploration de l'équilibre hydrominéral

2.1. Mesures des volumes hydriques

2.7.7. *Principes généraux*

La détermination des divers espaces de diffusion de l'eau peut s'effectuer *grâce aux différences de perméabilité de la paroi cellulaire et de la membrane cellulaire vis-à-vis de composés chimiques* injectés par voie veineuse.

Les uns, retenus dans les vaisseaux car ne franchissant pas la paroi capillaire, serviront à mesurer l'eau plasmatique.

D'autres, traversant la paroi vasculaire mais non la membrane cellulaire, permettront d'évaluer le compartiment extracellulaire, le compartiment interstitiel sera déduit par simple soustraction.

Certains enfin diffusent à l'intérieur des cellules, mais aussi dans tous les autres secteurs, et donnent l'espace de diffusion total dont l'espace intracellulaire sera déduit par soustraction.

2.7.2. *Méthodes*

2.1.2.1. Eau totale

On peut utiliser l'urée, l'antipyrine, l'eau lourde ou l'eau tritiée qui diffusent dans l'ensemble des secteurs. L'eau totale représente en valeur absolue 40 à 50 litres.

En pratique, ces méthodes sont trop lourdes ou trop complexes et **on apprécie donc l'eau totale par la simple pesée (60 à 65 % du poids du corps).**

2.1.2.2. Secteur extracellulaire

On s'adresse aux substances ne traversant pas la membrane cellulaire : thiocyanate de Na, inuline, mannitol ou ^{24}Na radioactif. L'eau extracellulaire (20 % du poids corporel) représente 12 à 16 litres. **En clinique, l'hydratation du compartiment extracellulaire s'apprécie par le pli cutané et la tension artérielle.**

2.1.2.3. Eau plasmatique

On peut utiliser des colorants comme le bleu Evans, le rouge Congo, mais **en pratique le volume d'eau plasmatique s'apprécie par la mesure de l'héma-**

tocrite et accessoirement par le taux des protéines ou le nombre des hématies. Rappelons que l'hématocrite est le rapport du volume globulaire sur le volume sanguin total. Sa valeur normale est de 40 à 50 % chez l'homme, de 35 à 45 % chez la femme.

On obtient ainsi, pour le volume d'eau plasmatique (souvent confondu avec le volume sanguin total), 4,5 à 5 litres. D'autre part, rappelons que dans 1 litre de plasma, du fait des protéines et lipoprotéines, il n'y a que 930 ml d'eau pure.

2.1.2.4. Clairance de l'eau libre

Elle se définit comme la quantité d'eau pure qu'il faudrait soustraire ou ajouter à l'urine pour que son osmolalité soit égale à celle du plasma. On peut en effet considérer que l'urine est la somme **d'une diurèse osmotique** destinée à éliminer, de façon isotonique au plasma, la charge osmolaire quotidienne (environ 800 mOsm pour une alimentation normalement salée) et **d'une diurèse aqueuse** indépendante des substances dissoutes à éliminer.

• Elle correspond à la *différence entre le débit urinaire V et la clairance osmolaire* C_{osm} *:*

$C_{osm} = U_{osm} \times V/P_{osm}$ où
P_{osm} = concentration osmotique du plasma en mOsm/1,
U_{osm} = concentration osmotique de l'urine en mOsm/1
V = débit urinaire en ml/min.

$$\text{Clairance de l'eau libre } C_{H_2O} = V - C_{osm}$$

$$= V - \frac{U_{osm} \times V}{P_{osm}}$$

$$= V \left[1 - \frac{U_{osm}}{P_{osm}} \right]$$

Lorsque les urines sont concentrées, la clairance de l'eau libre est négative, alors qu'elle est positive lorsque les urines sont diluées. Ainsi la clairance est - 1 pour éliminer les 800 mOsm quotidiens lorsque la diurèse est de 1,4 1 ; **elle** est à + 3,6 pour une diurèse de 8 1 dans le diabète insipide.

• **La** détermination au laboratoire des osmolalités plasmatique et urinaire permet donc un calcul facile de la clairance de l'eau libre. Au lit du malade, les osmolalités sont calculées de manière approchée, utilisant les formules ci-après.

Osmolalité plasmatique approchée mOsm/1 $= \left[\begin{array}{c}\text{Urée plasmatique} \\ \times 16 \text{ g/l}\end{array}\right] + \left[\begin{array}{c}\text{Glucose} \\ \times 5{,}5 \text{ g/l}\end{array}\right] + \left[\begin{array}{c}(\text{Na} + \text{K}) \\ \times 2 \text{ mEq/l}\end{array}\right]$

Osmolalité urinaire approchée mOsm/1 $= \left[\begin{array}{c}\text{Urée urinaire} \\ \times 16 \text{ g/l}\end{array}\right] + \left[\begin{array}{c}(\text{Na} + \text{K}) \\ \times 2 \text{ mEq/l}\end{array}\right]$

2.2. Mesure des électrolytes

2.2.1. Osmolarité et osmolalité plasmatiques — Cryoscopie

L'abaissement du point de congélation du plasma (cryoscopie) est proportionnel au nombre total d'ions et de molécules non dissociées. Les résultats normaux, exprimés en milliosmoles/litre (de plasma) sont de 300 mOsm/1 (osmolarité). Exprimés en mOsm/kg de solvant (l'eau en fait), ils constituent l'osmolalité, pour laquelle l'abaissement du point de congélation est de - 0,56 **°C.**

L'osmolalité plasmatique approchée est de 297 mOsm/1, en tenant compte de l'urée, du glucose, des ions $Na^{4'}$ et K^+. Lorsque la natrémie x 2 est prise seule en considération, le nombre de mOsm/1 chute à environ 286 (143 x 2).

2.2.2. Détermination séparée des électrolytes — lonogramme — Bilan électrolytique

2.2.2.1. lonogramme sanguin

> CATIONS

• ***Sodium***

Dosé par photométrie d'émission de flamme ou par potentiométrie à l'aide d'électrodes sélectives ou encore par colorimétrie, le sodium plasmatique ou sérique est de **138 à 143 mEq/1 ou mmol/1.** Il représente 95 % des cations extracellulaires.

• ***Potassium***

Dosé de la même manière que le sodium, ses valeurs sont plus basses car c'est un cation intracellulaire : 3,5 à 4,5 **mEq/1 ou mmol/1.** En pratique clinique l'ECG peut donner de bons renseignements sur la kaliémie : onde T plate, sous-dénivellation de ST signent une hypokaliémie alors qu'une onde T pointue avec risque de fibrillation ventriculaire est l'apanage des hyperkaliémies.

Notons aussi que le dosage du K^+ ne peut se faire que sur plasma ou sérum non hémolyse, en raison de la richesse potassique des globules rouges. Le garrot et le « pompage » musculaire au cours des prélèvements risquent aussi d'élever le taux de la kaliémie.

• ***Calcium et magnésium*** plasmatique ne sont pas systématiquement dosés. Ils reçoivent une valeur moyenne de 7 **mEq/1** pour renforcer la colonne des cations.

► ANIONS

• ***Chlorures***

Dosés par colorimétrie, par coulométrie ou par potentiométrie, les ions chlorures représentent l'anion extracellulaire le plus important : **95 à 105 mEq/1 ou mmol/1.**

• ***Bicarbonates***

Les ions CO_3H^- sont dosés par gazométrie ou manométrie (libération du CO_2 par un acide fort), par colorimétrie ou par réaction enzymatique. Leur taux est 22 à 28 **mEq/1 ou mmol/1.**

Ces quatre ions forment l'ionogramme classique, auquel on adjoint souvent les dosages des protéines, de l'urée et de la créatinine.

• ***Protéines***

Si le dosage par densimétrie est abandonné, la colorimétrie par réaction du biuret est très classique, de même que la lecture par réfractométrie directe.

Le taux de 65 à 75 g/1 correspond **à 15 à 20 mEq/1** dans la colonne des anions.

Les autres anions plasmatiques ne sont habituellement pas dosés. Ce sont les acides organiques (6 mEq/1), les phosphates (2 mEq/1), les sulfates (1 mEq/1) qui reçoivent donc, dans l'équilibre anions-cations, une valeur moyenne de **9 mEq/1.**

Ainsi la balance anions-canions peut-elle être calculée ; physiologiquement 150 à 155 mEq/1 de cations doivent être équilibrés par le même nombre d'anions. En cas de déficit anionique, on parlera d'un « trou » anionique, le plus souvent observé au cours des acidoses métaboliques.

En pratique courante, le bilan est considéré comme équilibre lorsque la balance cations-anions ne dépasse pas +/- 5 mEq/1.

• ***Urée***

Catabolite azoté fondamental, son excrétion rénale l'a rendu pendant des décennies indispensable pour apprécier le fonctionnement rénal. Son taux normal est de **3,3 à 6,6 mmol/1** (0,20 à 0,40 g/1). La variabilité de son élimination rénale en fonction du débit urinaire lui fait désormais préférer le dosage de la creatininémie.

• ***Créatinine***

Reflet de la filtration glomérulaire, c'est un excellent marqueur de l'état rénal. Son dosage est colorimétrique ou enzymatique, donnant comme valeurs usuelles 70 **à 120 µmol/l**.

• ***Hématocrite***

Représentant le rapport du volume globulaire sur le volume sanguin total x 100, il est très souvent réalisé en même temps que l'ionogramme car il donne des renseignements précieux sur le volume liquidien plasmatique. Les valeurs moyennes sont :

- 50 % chez l'homme ;

- 45 % chez la femme.

Le prélèvement sanguin devra alors être fait sur héparinate de lithium. On pourra ainsi parler **d'hémodilution** ou **d'hémoconcentration** suivant que l'hématocrite sera élevé ou abaissé. Les mêmes données peuvent être fournies par le taux des protéines ou par le nombre de globules rouges.

2.2.2.2. *Bilan électrolytique urinaire*

II ne se conçoit que sur des urines de 24 h, dont la qualité pourra s'apprécier par le dosage de la créatininurie dont on connaît la constance (0,18 mmol/kg de poids chez la femme ; 0,22 mmol/kg chez l'homme). Il ne peut être interprété que couplé à l'ionogramme sanguin effectué simultanément et après avoir apprécié la valeur de la fonction rénale par la clairance de la créatinine ou la créatininémie.

Ce bilan comprend essentiellement trois examens : urée, sodium, et potassium urinaires.

> URÉE

La concentration uréique urinaire est une bonne façon de savoir quel est le pouvoir de concentration du rein. Cependant, en dehors de l'insuffisance rénale ou du calcul d'une ration calorique, son intérêt reste relativement limité. Les valeurs observées sont de **15 à 600 mmol/24 h** en fonction de l'importance de l'apport protéique alimentaire.

> SODIUM

La natriurie est le reflet du bilan de ce cation car, à l'état normal, le rein est le seul organe capable chez l'homme de régler le bilan sodique en adaptant les sorties aux entrées. Les valeurs du Na urinaire (0 à 300 ou 500 mmol/24 h) sont donc **appropriées ou inappropriées.**

Appropriée, la natriurie représente exactement la ration alimentaire sodée, diminuée des pertes sudorale et fécale, normalement faibles. Ainsi un sodium urinaire élevé, en dehors de toute déshydratation, n'est que la conséquence d'un régime salé. Un sodium urinaire bas traduit soit un régime peu salé, soit la réponse normale du rein à une perte extrarénale de sodium (vomissements, diarrhée ou sudation abondante).

Inappropriée, la natriurie indique que le rein n'est pas apte à préserver la composition et le volume du secteur extracellulaire, comme par exemple au

cours d'une hyperhydratation extracellulaire lors d'une insuffisance cardiaque globale ou encore chez un patient avec des signes de déshydratation extracellulaire et une fuite urinaire sodique persistante.

► POTASSIUM

Pour la kaliurie (0 à 150 mmol/24 h), le même mode de raisonnement est valable mais le guide doit être ici le taux de **la kaliémie.**

A kaliémie basse, un potassium urinaire bas est approprié devant une déperdition en général digestive, un potassium urinaire élevé atteste, par contre, de l'origine tubulaire de la fuite potassique (administration de salidiurétiques ou de corticoïdes, hyperaldostéronisme).

Avec une kaliémie élevée, un potassium élevé est une réponse appropriée à une source endogène d'ions K^{+}, généralement par hypercatabolisme ; un potassium urinaire bas est la marque d'une insuffisance rénale, d'une insuffisance surrénale ou de l'administration d'un diurétique dit d'« épargne potassique ».

3. Applications pathologiques. Grands syndromes de perturbation de V équilibre hydrominéral

3.1. Hyperhydratation extracellulaire — Œdèmes

Infiltration et accumulation d'eau dans le tissu cellulaire sous-cutané, parfois dans les séreuses et les organes, les œdèmes concernent essentiellement le secteur interstitiel et sont la conséquence d'un bilan sodé positif. Ils sont très fréquemment observés et de causes très variables.

Sur le plan clinique, le premier signe de **l'inflation hydrosodée** est une prise de poids rapide. Lorsque la variation dépasse 3 kg chez l'adulte soit une rétention de 400 mmol de sodium, les œdèmes sont facilement visibles.

Le signe biologique constant est l'existence d'une **natriurie basse** (au dessous de 20 mmol/24 h) toujours inférieure aux apports.

3.1.1. Mécanismes et physiopathologie

Le mécanisme le plus habituel est la **rétention de NaCl** qui augmente la pression osmotique extracellulaire, laquelle attire l'eau. Cette action « hydropigène » du sel, est confirmée par l'efficacité usuelle du régime sans sel. Cependant, d'autres facteurs physiopathologiques sont parfois associés comme **l'abaissement de la pression oncotique des protéines du plasma** ou une perturbation de l'hémodynamique avec **augmentation de la pression veineuse.** L'intrication des mécanismes dépend des étiologies (figure 1.3).

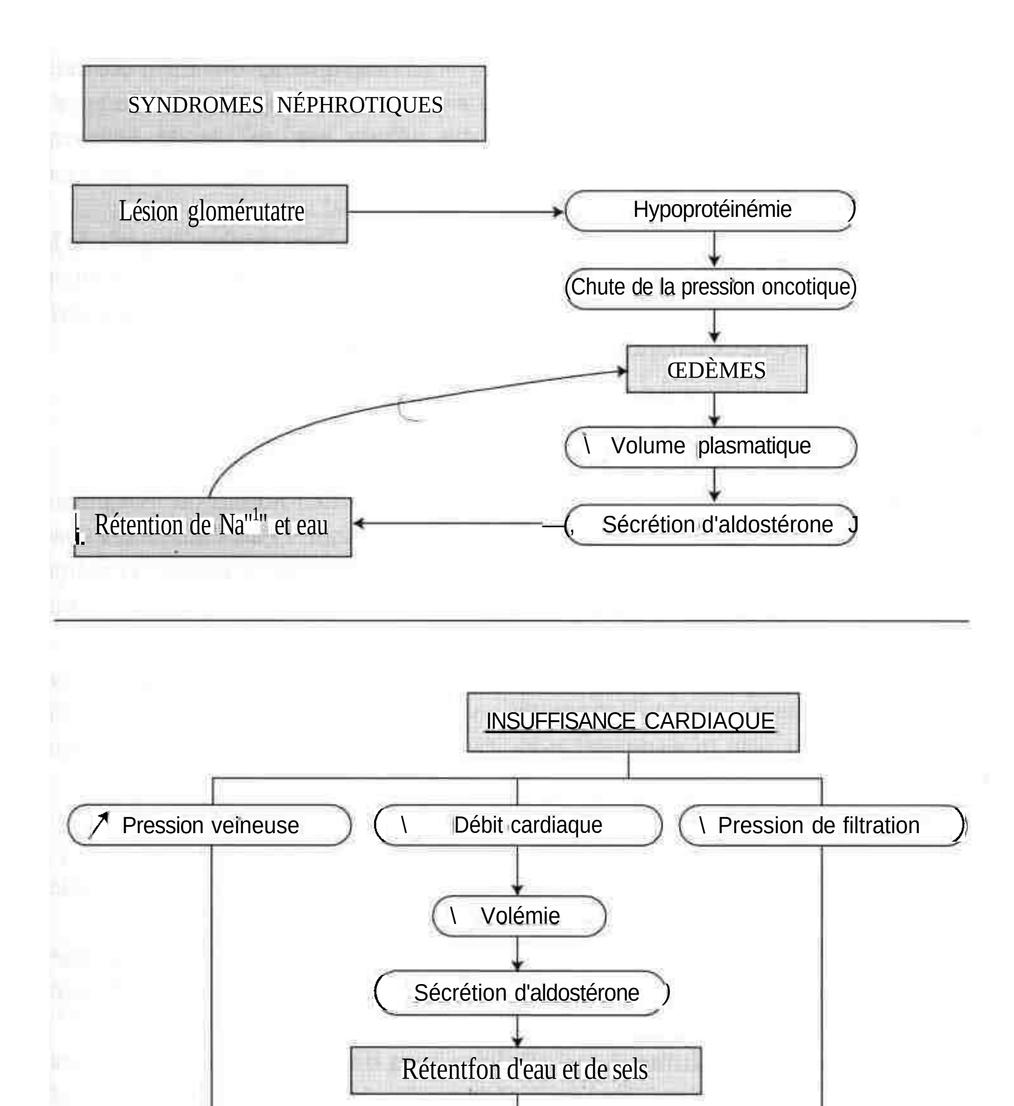


Figure 1.3 • Exemples de mécanisme d'apparition des œdèmes

3.1.2. *Principales étiologies*

L'insuffisance cardiaque, quelle qu'en soit la cause, entraîne une diminution du flux rénal et donc de la filtration avec augmentation de la reabsorption tubulaire sodique par hyperaldostéronisme secondaire.

Les syndromes néphrotiques s'accompagnent d'une hypoprotéinémie liée à la fuite glomérulaire des protéines plasmatiques et d'un hyperaldostéronisme secondaire lié à la diminution relative du volume plasmatique.

Les néphropathies glomérulaires aiguës s'accompagnent souvent d'œdèmes lors d'une glomérulonéphrite aiguë ou d'une toxémie gravidique.

***Les** cirrhoses décompensées* où l'œdème débute par une ascite associent rétention hydrosaline, hypertension portale, hypoalbuminémie et compression de la veine cave inférieure par l'épanchement péritonéal.

La dénutrition avec carence protidique du kwashiorkor entraîne un arrêt de la croissance, un amaigrissement souvent masqué par l'œdème. La rétention hydrosodée est probablement due à l'hypoprotéinémie secondaire à la négativisation importante de la balance azotée.

3.2. Syndromes de déshydratation

En raison de leur extrême fréquence aussi bien chez l'adulte ou le vieillard que chez le nourrisson (particulièrement sensible puisque l'eau totale représente chez lui 75 à 80 % du poids du corps, avec un secteur extracellulaire d'environ 35 à 40 %), ces syndromes sont importants à connaître, d'autant que les règles de réanimation sont maintenant classiques.

Il est habituel de décrire la déshydratation extracellulaire, après l'hyperhydratation de ce secteur, puis la déshydratation et l'hyperhydratation cellulaires. En fait les désordres sont très souvent associés et *quelques règles générales* doivent donc d'abord être rappelées.

L'appréciation de l'état clinique donne déjà de précieux renseignements :

- tension artérielle basse, pli cutané dans *la déshydratation extracellulaire ;*
- sensation de soif, température élevée, langue sèche ou « rôtie », troubles neuropsychiques éventuellement dans *la déshydratation intracellulaire.*

Au plan physiopathologique, les perturbations initiales se font toujours dans le secteur extracellulaire et les modifications du milieu intracellulaire sont donc toujours secondaires.

Les variations du volume extracellulaire sont directement liées aux variations du contenu en sodium de l'organisme.

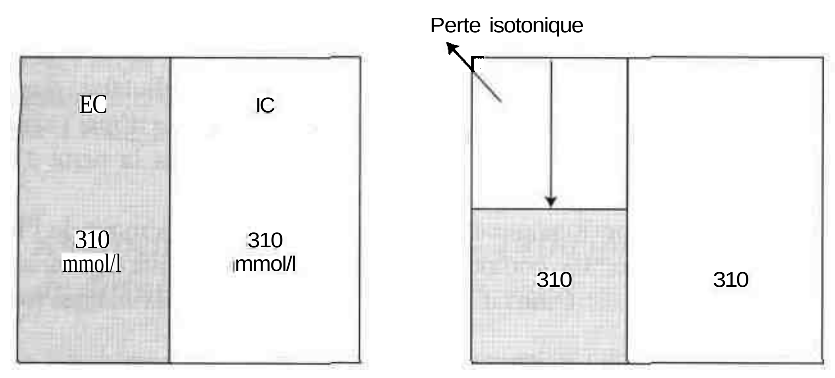
La déshydratation extracellulaire n'est jamais liée à un défaut d'apport isolé de sodium, quand le fonctionnement du rein est normal ; elle est donc toujours secondaire à une fuite extrarénale de sodium.

3.2.1. Déshydratation extracellulaire

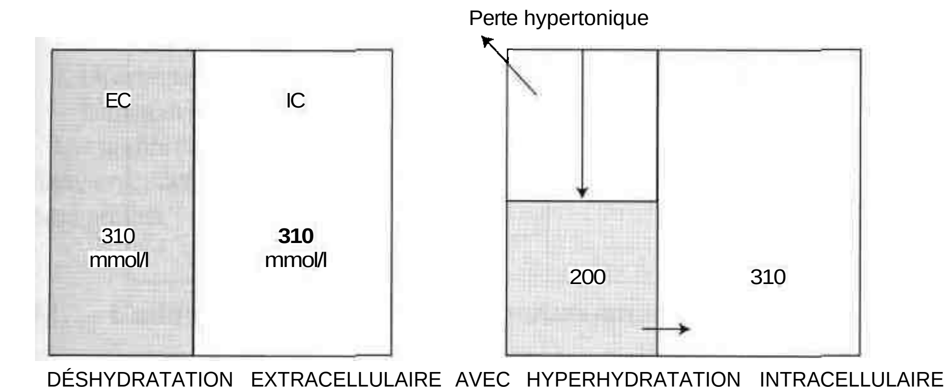
C'est la diminution du volume du compartiment extracellulaire sans modification du volume du compartiment cellulaire lorsqu'elle est isolée (ce qui implique une pression osmotique des liquides extracellulaires sans changement), ou avec hyperhydratation cellulaire associée (lorsque les liquides extracellulaires deviennent hypotoniques).

- *Les signes biologiques* plasmatiques sont liés à l'hémoconcentration : hématocrite augmenté, protéines totales élevées, urée et créatinine augmentées par insuffisance rénale fonctionnelle, b 1

S>- Va sodium est généralement normal car *l'hyponatrémie est masquée par l'hémoconcentration.*



DÉSHYDRATATION EXTRACELLULAIRE PURE



DÉSHYDRATATION EXTRACELLULAIRE AVEC HYPERHYDRATATION INTRACELLULAIRE

Figure 1.4 • Exemples de mécanisme de déshydratation extracellulaire.

• Les causes sont celles de toute perte saline :

- **rénales** (Na urinaire > 30 mmol/24 h) lors de l'insuffisance surrénale, de l'insuffisance rénale chronique des néphrites interstitielles, de diurèses anormales par effet osmotique (diabète, perfusion de mannitol) ou par diurétiques ;

- **extrarénales** (Na urinaire < 10 mmol/24 h) lors de pertes digestives (vomissements, diarrhées, fistules, aspiration gastroduodénale) ou *de pertes cutanées* (hypersudation, brûlures, mucoviscidose).

• *Les mécanismes* et la présence ou l'absence d'hyperhydratation cellulaire associée sont expliqués par la nature de la perte.

• *La thérapeutique* sera adaptée au type de syndrome en cause :

- *sérum salé isotonique* (9 g/1 de NaCl = 3,5 g de Na'1' =152 mmol pour 11) pour la déshydratation extracellulaire pure ;

- *sérum salé hypertonique* (à 10 %, 10 ml = l(g de NaCl =17 mmol) dans le cas d'un syndrome de déshydratation hypotonique où l'hyperhydratation cellulaire existe.

3.2.2. *Déshydratation intracellulaire*

C'est la diminution de volume du compartiment intracellulaire, due à un mouvement d'eau vers le compartiment extracellulaire, du fait d'une augmentation de la pression osmotique de celui-ci. Le mécanisme est la perte d'eau > perte saline ou perte hypotonique.

• *Le signe biologique* fondamental est **l'hypernatrémie,** témoin de l'hyperosmolalité plasmatique. La composition osmolaire et ionique des urines est variable et dépend des sécrétions d'ADH et d'aldostérone, elles-mêmes fonction de la cause du trouble.

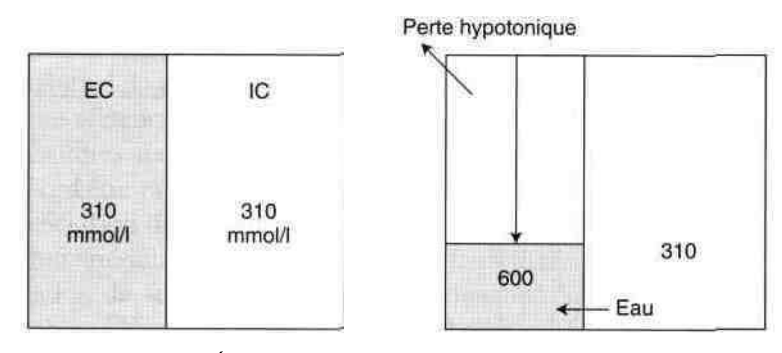


Figure 1.5 • Exemples de mécanisme physiopathologique d'une déshydratation intracellulaire.

• *Les étiologies* principales sont l'apport insuffisant d'eau (naufragés, sujets perdus en zone désertique, sujets comateux), le diabète insipide, les diurèses osmotiques.

La déshydratation cellulaire s'accompagne souvent d'une déshydratation associée du secteur extracellulaire donnant alors une **déshydratation globale.** L'origine en est une perte associée d'eau et de sodium, la perte d'eau prédominant. Les signes propres de la déshydratation de chaque secteur sont alors associés avec, sur le plan biologique, une hypematrémie de déshydratation intracellulaire et un hématocrite élevé, des protéines totales augmentées témoignant de l'hémoconcentration due à la perte extracellulaire.

• *Le traitement* repose sur l'apport d'eau, soit par voie buccale, soit par voie intraveineuse grâce à l'utilisation de solutés glucoses isotoniques qui, après métabolisation du glucose, laissent leur eau diluer le compartiment extracellulaire.

À titre d'exemple, la quantité d'eau à apporter à un sujet de 70 kg présentant à l'ionogramme Na'1' : 160 mmol/1 et K"1" : 5 mmol/1 soit (+ 7) 172 mEq/1 de cations et donc 344 mEq/1 d'ions soit un excès ionique de 344 - 310 = 34 mEq/1, sera donnée par le calcul suivant :

Nombre de ml d'eau à apporter = 1 000 x 442/310 # 1 500 ml
où 442 est l'excès total de mEq chez cet individu où le secteur extracellulaire est normalement d'environ 13 1 soit 13 x 34 = 442, qui doivent être dilués pour obtenir l'isotonie à 310 mEq/1.

4. Approche technologique — Principales méthodes de dosage

Nous décrirons dans ce chapitre les principales méthodes de dosage des constituants suivants :
- sodium ;
- potassium ;
- chlorure ;
- bicarbonate ;
- hématocrite.

Les nombreux autres constituants mentionnés dans ce chapitre (protéines, calcium, urée, créatinine...) seront décrits plus tard à l'occasion de leur développement propre.

4.1. Cations plasmatiques — sodium et potassium

Ces cations peuvent être dosés par quatre techniques différentes : photométrie d'émission de flamme, électrométrie par électrodes sélectives, colorimétrie et méthode enzymatique.

4.1.1. Photométrie de flamme

4.1.1.1. Principe

• La flamme est utilisée pour convertir l'élément à doser à l'état de vapeur atomique où les atomes subiront des transformations réversibles entre un état de base et un état excité : un électron passe sur une orbitale plus externe à niveau d'énergie plus élevé et restitue ensuite cette énergie sous forme de photons en revenant à son niveau initial. Les photons émis ont des fréquences caractéristiques de l'élément, qui constituent le spectre d'émission de cet élément (les métaux alcalins — lithium, sodium ou potassium n'ont en effet qu'un électron sur la couche périphérique).

4.1.1.2. Appareillage

Quel que soit le fabricant, l'appareillage comporte toujours quatre éléments principaux.

► NÉBUUSEUR

II permet d'envoyer dans la flamme la solution sérique ou urinaire ou tout autre liquide biologique, sous forme d'un aérosol de fines gouttelettes homogènes.

> BRÛLEUR

Associé étroitement au nébulisateur, il utilise habituellement le butane ou le propane qui donnent une flamme proche de 2 000°C.

► ANALYSEUR OPTIQUE

Les photons émis ont une fréquence caractéristique du métal vaporisé. Chaque métal émet plusieurs raies et on choisit la plus caractéristique et la plus intense :

Na : 589 nm (raie jaune du sodium)
K : 767 nm
Li : 671 nm.

Un sélecteur de longueur d'onde, à prisme, à réseau ou généralement à filtres, est indispensable.

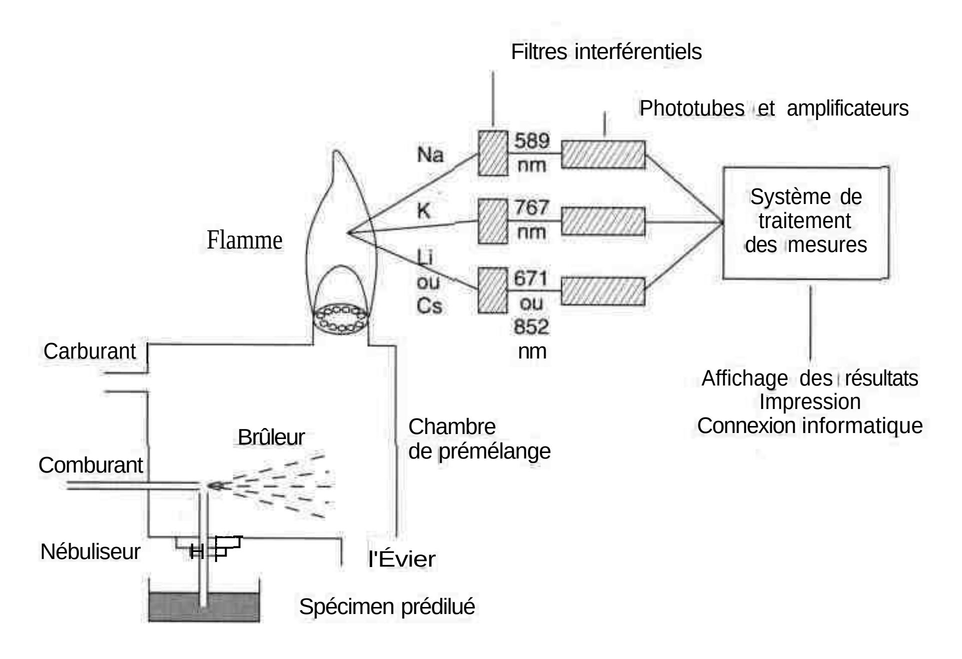


Figure 1.6 • Schéma de principe d'un photomètre de flamme.

Les voies optiques sont au nombre de deux :

- l'une possède un filtre à 671 nm (Li) et sert de référence (étalon interne) en effet l'échantillon est toujours dilué dans une solution d'étalon interne, ce qui permet de tenir compte des variations de débit des gaz, de l'échantillon, de la température de la flamme. Certains appareils utilisent le césium comme étalon interne et permettent ainsi de doser le lithium sérique au cours des traitements lithiés en psychiatrie ;
- l'autre voie est double et reçoit au travers des filtres correspondants les signaux du sodium et du potassium.

▶ DISPOSITIF DE MESURE

II comprend les cellules photoélectriques, les phototubes d'amplification, le dispositif de conversion du signal électrique en affichage numérique exprimé en mmol/1 avec déduction automatique du signal de l'étalon interne.

▶ DISPOSITIFS OPTIONNELS

Ils améliorent grandement la praticabilité de l'appareillage : diluteur automatique, passeur d'échantillons, imprimante, connexion à un système informatique.

4.1.2. Potentiométrie — Électrodes sélectives

Depuis plus d'une décennie la mesure électrométrique des cations alcalins du sang est devenue habituelle. Ce développement est dû à la commercialisation **de** petits analyseurs adaptés à l'urgence et aux courtes séries dont l'automatisme rend l'emploi facile et attrayant.

▶ TRAITEMENT **DE L'ÉCHANTILLON**

La mesure du sodium et du potassium par électrode sélective peut s'effectuer de deux façons :

- soit sur des *échantillons non dilués,* ce qui donne accès à l'activité de l'ion telle qu'elle existe dans le plasma et permet l'utilisation de sang total. On parle de **potentiométrie directe ;**
- soit sur des *échantillons dilués* où l'activité de l'ion est très différente de celle du spécimen originel. On parle alors de **potentiométrie indirecte,** abus de langage car la potentiométrie elle-même reste bien sûr toujours directe.

> TRAITEMENT DES DOSAGES — MODULE DE MESURE

Les électrodes fonctionnent comme des piles de concentration et mesurent une différence de potentiel de part et d'autre d'une membrane sélective, ddp qui est reliée à l'activité de l'ion. Pour la mesure, on a recours à un module comportant, outre l'électrode de mesure, une *électrode de référence* caractérisée par la

stabilité de son potentiel propre. Les électrodes de référence sont le plus souvent des électrodes au chlorure d'argent ou au calomel.

Les électrodes de sodium sont des électrodes de verre (verres spéciaux à l'oxyde de lithium et d'aluminium jouant le rôle de membrane). On obtient sur la membrane des « sites anioniques » tels que seul (ou presque) l'ion sodium va pouvoir pénétrer et générer un potentiel de membrane qui est proportionnel à la différence de concentration en ions $Na^{4'}$ des deux côtés de la membrane.

Toute la technologie des appareils électrométriques vise à déterminer cette différence de potentiel qui est très faible.

***Les** électrodes de potassium* sont toutes basées sur l'emploi de valinomycine incorporée, soit dans du PVC, soit dans une gomme de silicone. La valinomycine est un peptide cyclique solide, d'origine bactérienne, capable de « séquestrer » les ions $K^{'1''}$ et de former avec eux un complexe stable.

> TRAITEMENT DES MESURES — RELATION ENTRE ACTIVITÉ ET CONCENTRATION

Les électrodes sélectives répondent à l'activité des ions. La relation entre l'activité mesurée par l'électrode sélective sur échantillon non dilué et la concentration de l'ion considéré peut être exprimée sous forme mathématique. En fait il suffira **de comparer les différences de potentiel obtenues aux bornes du système, d'une part avec un étalon et d'autre part avec l'échantillon inconnu.**

Seule la potentiométrie directe, avec échantillon non dilué, donne accès à la valeur vraie de l'ion mesure. Si l'on utilise la potentiométrie indirecte (dilution au 1720e en général) ou la photométrie de flamme (dilution au 17200e), les résultats devront être corrigés en fonction de l'eau plasmatique vraie. Celle-ci représente **93 % du volume plasmatique,** les 7 % restant sont dus aux protéines et lipoprotéines. En présence d'hyperlipoprotéinémies, en particulier à triglycérides ou d'hyperprotéinémies, le pourcentage d'eau plasmatique est modifié et la correction pourra être apportée par la formule de Waugh :

$$\text{Eau plasmatique} = 99{,}1 - 0{,}073\ (P) - 0{,}103\ (L)$$

où (P) représente le taux de la protéinémie en g/1 et (L) le taux de la lipidémie, apprécié par la somme cholestérol + triglycérides en g/1.

> CONDUITE À TENIR PRATIQUE

Chez le sujet normal, les concentrations obtenues par potentiométrie directe sont supérieures d'environ 7 % par rapport à celles obtenues par potentiométrie indirecte ou par photométrie de flamme.

Or, ce sont ces dernières que les cliniciens ont l'habitude d'utiliser. Cela pose donc un problème pratique dans la mesure où la différence est trop importante pour être ignorée et qu'une adaptation des connaissances et des habitudes des utilisateurs cliniciens à l'usage courant de l'expression en concentration par litre d'eau plasmatique vraie, n'est pas réalisable à court terme.

Dès lors, ce sont les résultats de la potentiométrie directe qui sont systématiquement minores d'environ 7 % pour les corréler à ceux de la photométrie de flamme ou de la potentiométrie indirecte.

Dans le cas des appareils à potentiométrie indirecte (environ la moitié des analyseurs multiparamétriques de biochimie), il faudra corriger les fausses hyponatrémies des hyperlipidémies et des hyperprotidémies en calculant la valeur vraie de l'eau plasmatique selon la formule ci-dessus.

4.1.3. Techniques calorimétriques

Elles sont d'introduction récente et basées sur la complexation très sélective des ions par des chromo-ionophores macrocycliques avec, par exemple, échange quantitatif entre le lithium déjà présent et le sodium intégré à sa place dans l'ionophore. L'échange s'accompagne d'une variation de l'absorbance à 500 nm proportionnelle à la concentration du sodium présent.

4.1.4. Techniques enzymatiques

Également d'introduction récente, elles sont encore peu utilisées.

4.1.5. Répartition des méthodes de dosage en France

À l'occasion des opérations de contrôle de qualité national obligatoire on peut connaître le pourcentage des diverses techniques utilisées par les quelques 4 000 laboratoires français.

Pour les dosages de sodium et potassium les photomètres de flamme et les appareils à électrodes sélectives étaient en 1999 répartis de la manière suivante :

- photométrie de flamme : 25,2 % ;
- potentiométrie directe : 39,3 %
- potentiométrie indirecte : 29,2 %.

4.2. Dosage de l'anion chlorure

4.2.1. Méthodologies

Principal anion plasmatique, l'ion chlorure est très communément dosé par des méthodes chimiques et par des méthodes physicochimiques.

4.2.1.1. Techniques chimiques

Elles utilisent des sels de mercure qui, en présence d'indicateurs appropriés, donnent après combinaison avec les ions Cl" une réaction colorée permettant un dosage colorimétrique.

▶ MÉTHODE DE SCHALES

Une solution de diphénylcarbazone, virant du jaune au violacé, permet un dosage colorimétrique donnant des résultats précis.

▶ MÉTHODE DE ZALL

Mise au point pour les appareils automatiques, cette technique utilise le thiocyanate de mercure avec lequel les chlorures réagissent pour donner, selon la réaction suivante, des ions sulfocyanures :

$$Cl^- + Hg(SCN)_2 \rightarrow HgCl_2 + 2\ SCN^-$$

qui réagiront à leur tour avec du nitrate ferrique produisant du sulfocyanure ferrique.coloré en rouge-brun.

> MÉTHODE AU TPTZ (TRIPYRIDYL-TRIAZINE)

Elle utilise du nitrate mercurique et du sulfate ferreux qui donnent une coloration bleue lue à 595 nm avec le colorant TPTZ.

Ces méthodes sont très précises mais polluantes, des déchets de chlorure mercurique étant déversés à l'évier.

4.2.1.2. Techniques physicochimiques

> TECHNIQUE COULOMÉTRIQUE

Par passage du courant entre deux électrodes en argent, il se forme des ions Ag^+ qui se combinent aux ions Cl^- de la solution et produisent un précipité de chlorure d'argent.

Quand tous les ions Cl^- sont précipités, et que des ions Ag^+ apparaissent en excès, la conductibilité de la solution augmente alors brusquement, indiquant la fin de la réaction.

La prise d'essai est de l'ordre de 20 µl de plasma ou de sérum ; la détermination est très précise sous agitation constante.

Des chloridomètres électroniques ont été réalisés selon ce principe.

▶ TECHNIQUE ÉLECTROMÉTRIQUE PAR ÉLECTRODE SÉLECTIVE

L'électrode est constituée par une membrane compacte de chlorure d'argent. Les autres halogénures (Br^-, I^-, F^-) interfèrent sur le dosage.

Cette électrode équipe un assez grand nombre d'automates.

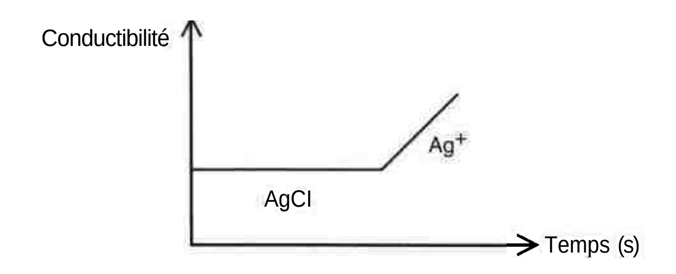


Figure 1.7 • Principe d'un coulomètre.

4.2.2. *Répartition des techniques*

En 1999, sur 3 500 laboratoires la répartition était la suivante :
- *méthodes chimiques* (colorimétrie et mercurimétrie) : 27,6 % ;
- *méthode coulométrique*, 7,2 % ;
- *méthode potentiométrique* directe : 32 % ;
- *méthode potentiométrique* indirecte : 23,3 %.

4.3. Dosage de l'anion bicarbonate

Sous cette dénomination, on mesure, en pratique courante, le CO_2 plasmatique. En effet, *stricto sensu*, les bicarbonates HCO_3^- correspondent à la différence entre le CO_2 total et le CO_2 dissous, le CO_2 lié aux protéines sous forme carbaminée étant en effet mineur.

4.3.1. *Méthodes de dosage*

4.3.1.1. *Techniques volumétriques*

Elles consistent à libérer l'anhydride carbonique à partir des bicarbonates grâce à un réactif acide. L'étalonnage est réalisé à partir de solutions de bicarbonate.

Le système « seringue Harleco », conçu sur ce principe, est encore répandu.

4.3.1.2. *Techniques enzymatiques*

Elles reposent sur la carboxylation enzymatique **du** phosphoénoipyruvate à partir des bicarbonates à doser dans le plasma :

$$HCO3^- + \text{Phosphoénoipyruvate} \xrightarrow{1} \text{oxaloacétate} + \text{phosphate}$$
$$\text{Oxaloacétate} + NADH + H^+ \xrightarrow{2} \text{malate} + NAD^{1}-$$

1 = Phosphoénoipyruvate-carboxykinase
2 = *Malate déshydrogénase.*

La diminution d'absorbance à 340 nm est donc proportionnelle au taux de bicarbonate. La méthode est adaptée sur de nombreux appareils automatiques.

4.3.1.3. Techniques électrométriques

Elles mettent en œuvre soit une électrode spécifique répondant sélectivement aux ions bicarbonates, soit une électrode de pH, le CO_2 diffusant à travers une membrane et modifiant le pH d'une solution alcaline, ce qui permet une mesure différentielle.

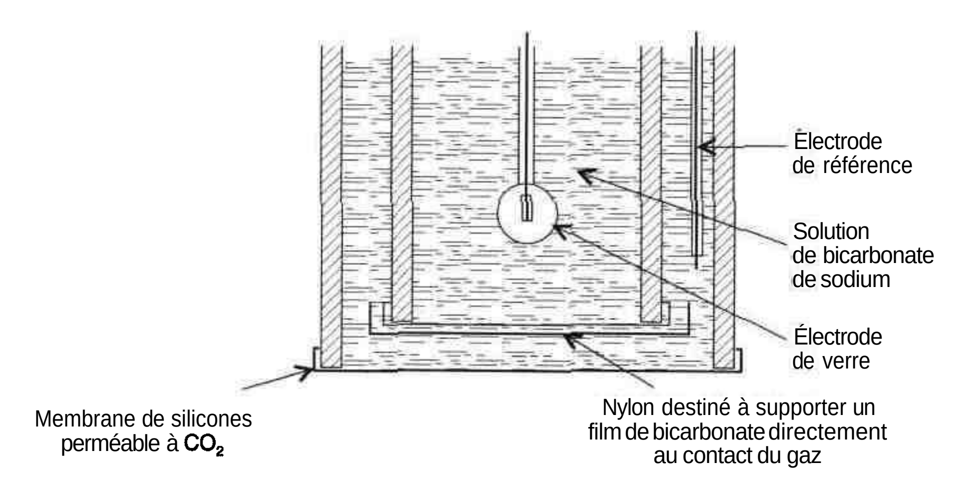


Figure 1.8 • Schéma d'une électrode de pCO_2.

4.3.1.4. Techniques catharométriques

Leur principe consiste à mesurer la variation de résistance nécessaire au rétablissement de l'équilibre thermique dans une cellule chauffée par une résistance lors du passage du flux de CO_2 dégagé à partir de l'échantillon par de l'acide lactique.

4.3.1.5. Autres techniques

Ce sont des techniques colorimétriques, soit après cinétique enzymatique, soit après virage d'un indicateur coloré (rouge de crésol ou phénolphtaléine).

4.3.2. Répartition des techniques

Au cours de l'échange interlaboratoire de 1998 où 3 150 réponses furent traitées, on observe les répartitions suivantes :
- volumétrie : 6,2 % ;
- technique enzymatique UV : 54,2 % ;

- électrométrie : 16,3 % ;
- catharométrie : 4,6 % ;
- réflectométrie : 12,1 %.

-4.4. Détermination de l'hématocrite

Rappelons que l'hématocrite est le rapport du volume globulaire sur le volume sanguin total x 100.

En pratique, ces volumes sont simplement appréciés en mesurant la hauteur du culot globulaire et la hauteur totale du sang incoagulable placé dans un tube soumis à **centrifugation.**

| L'agent anticoagulant est le plus souvent l'héparine sous forme d'héparinate de lithium lorsque le prélèvement est utilisé aussi pour le dosage de l'ionogramme et donc du sodium.

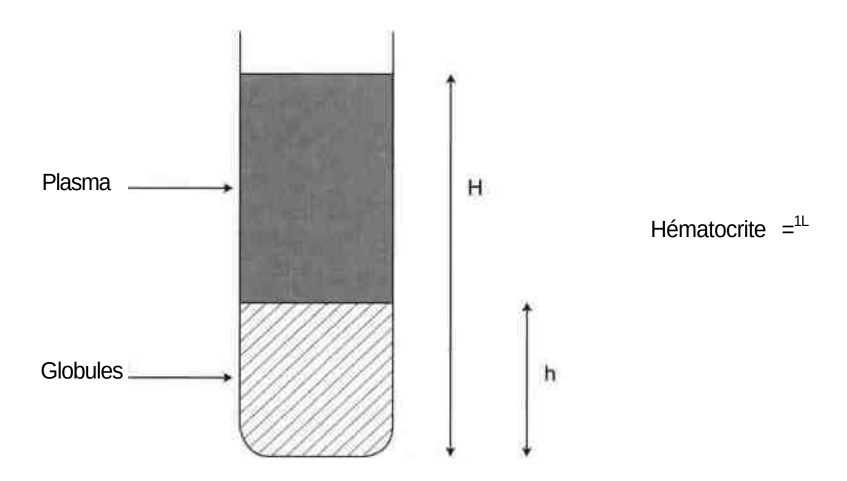


Figure 1.9 • Principe de détermination de l'hématocrite sanguin.

La centrifugation est conduite :
- soit dans un tube capillaire (microhématocrite) ;
- soit dans le tube originel du prélèvement (macrohématocrite).

La lecture des hauteurs dans chaque tube est soit manuelle, soit semi-automatique à l'aide de règles prégraduées.

L'hématocrite peut aussi être obtenu par calcul à partir du produit **VGM x nombre de globules rouges** fourni automatiquement par les automates d'hématimétrie, quelles que soient les techniques employées pour mesurer ces deux valeurs.

Les valeurs observées sont de 45 à 50 % chez l'homme, de 40 à 45 % chez la femme.

Références bibliographiques

M. Legrain et J.M. Suc. *Abrégé de Néphmiogie,* Masson, Paris, 1985 (3e éd.).

P. Métais et al. *Biochimie clinique*. **Tome 1,** 2e édition, Simep, Paris, 1990.

G. Richet et al. *Equilibre hydrélectrolytique normal et pathologique, Les précis du praticien,* 4e édition, J.B. Baillière, Paris, **1979.**

G. Siest, J. Henny et F. Schiele. *Références en Biologie Clinique,* Eisevier, Paris, 1990.

J. De Graeve et D. Grafmeyer. *Annales du contrôle national de qualité. Agence française de sécurité sanitaire des produits de*

2

Equilibre acidobasique

Marie-Laure Solera, Michel Lagente

Chez l'homme le pH des cellules et des liquides physiologiques de l'organisme ne doit varier que dans des limites étroites. Seules de faibles variations sont compatibles avec la vie.

L'organisme humain est confronté régulièrement à un afflux d'acides provenant de l'alimentation, surtout si celle-ci est camée, et de la respiration cellulaire. La régulation peut être prise en défaut si l'organisme est inondé de résidus acides comme cela peut se voir par exemple dans un diabète ou un traumatisme grave. La tendance permanente à l'acidose explique que l'organisme lutte plus efficacement contre les baisses de pH que contre l'alcalose.

Les moyens de lutte comprennent :

- **un moyen quasi instantané, automatique, mais assez vite débordé** : les systèmes tampons,
- **la mise en jeu d'un couple d'organes plus lents à réagir mais particulièrement puissants : les poumons et les reins.**

11. *Rappels physicochimiques*

1.1. pH

Le pH exprime l'acidité ou l'alcalinité d'un milieu. Il est égal au logarithme décimal de l'inverse de la concentration en ions H^+.

$$pH = \log \frac{1}{[H^+]}$$

Valeurs physiologiques = 7,36 - 7,42
Variations maximales compatibles avec la vie = 6,90 - 7,70

1.2. Systèmes tampons et équation d'Henderson-HasselbaIch

Ce sont des mélanges de substances en équilibre chimique s'opposant aux variations de pH avec une efficacité d'autant plus grande que leurs concentrations sont plus élevées.

Ces systèmes assurent dans l'organisme une régulation rapide et automatique.

Un système tampon comprend généralement :

- un acide faible et son sel de base forte
- une base faible et son sel d'acide fort.

La reaction d'équilibre s'écrit avec K comme constante d'équilibre :

$$\text{acide} \xleftrightarrow{K} \text{base}^- + H^+ \qquad H^+ = \frac{K\,(\text{acide})}{(\text{base}^-)}$$

Le pouvoir tampon est maximum si pH = pK (pK = log 1/K) c'est-à-dire s'il y a équilibre des 2 composantes du tampon.

Le tampon quantitativement le plus important dans l'organisme est le système bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$), acide carbonique (H_2CO_3).

Ce dernier est formé par CO_2 et H_2O sous l'influence d'une enzyme, l'anhydrase carbonique, et lors de sa dissociation, conduit à l'équilibre :

$$H_2O + CO_2 \xleftrightarrow{\text{anhydrase carbonique}} H_2CO_3 \xleftrightarrow{K} H^+ + HCO_3^- \qquad (1)$$

Si l'organisme est soumis à un acide fort, RH **(R^-H^+)** la partie alcaline du tampon va intervenir

$$\mathbf{HCO_3^-} Na^+ + \mathbf{H^+R^-} \longrightarrow H_2CO_3 + RNa \longrightarrow H_2O + CO_2$$

un acide fort a été transformé en un acide faible (CO_2) qui sera éliminé par les poumons.

Si l'organisme est soumis à une base forte, ROH (R^+OH^-) la partie acide du tampon va réagir

$$H_2CO_3 + R^+\,OH^- \longrightarrow R^+HCO_3^- + H_2O$$

une base forte a été transformée en une base faible ($R^+HCO_3^-$) qui sera éliminée par les reins.

Si nous appliquons la loi d'action de masse à la reaction (1) on peut écrire :

$$K = \frac{(H^+)\,(HCO_3^-)}{(H_2CO_3)} \rightarrow (H^+) = K\,\frac{(H_2CO_3)}{(HCO_3^-)} \rightarrow \frac{1}{(H^+)} = \frac{1}{K} \times \frac{(HCO_3^-)}{(H_2CO_3)} \rightarrow$$

$$\log \frac{1}{(H^+)} = \log \frac{1}{K} + \log \frac{(HCO_3^-)}{(H_2CO_3)}$$

d'où : $pH = pK + \log \dfrac{(HCO_3^-)}{(H_2CO_3)}$ dans lequel pK est égal à 6,1.

Or la concentration d'acide carbonique est proportionnelle à la concentration du CO_2 dissous avec un facteur de proportionnalité très faible que l'on peut intégrer dans la constante pK et qui ne change pratiquement pas celle-ci. On peut donc remplacer dans l'équation précédente le terme (H_2CO_3) par la concentration de CO_2 dissous. La loi de Henry (la quantité de gaz dissous dans un liquide est proportionnelle à la pression partielle du gaz à température constante) nous permet d'écrire que :

$(H_2CO_3) = a\,pCO_2$ où a est la constante de solubilité

Ceci nous conduit à l'équation d'Henderson Hasselbaich, fondamentale pour l'étude de l'équilibre acidobasique, dans laquelle on remarque que la partie .acide est représentée par le CO_2 et la partie alcaline par les bicarbonates :

$$\mathbf{pH = 6,1 + \log \quad apCO_2}$$

Équation d'Henderson Hasselbaich

1.3. Formes de transport du CO_2 sanguin

1.3.1. CO_2 dissous

Une très faible quantité du CO_2 sanguin (5 %) est sous forme de CO_2 dissous dont la quantité est fonction de la pCO_2, par l'intermédiaire de la constante de solubilité a. Une infime partie de ce CO_2 dissous est sous la forme d'acide carbonique par association à une molécule d'eau et est donc compris dans le CO_2 dissous.

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow H_2CO_3$$

En pratique on détermine la quantité de CO_2 dissous par la mesure de la pCO_2.

1.3.2. CO_2 à l'état de carbamate

5 % du CO_2 sanguin peuvent se trouver sous forme de carbamate **par** combinaison aux protéines plasmatiques ou à l'hémoglobine globulaire.

$$R - NH_2 + CO_2 \longrightarrow R - NH - COOH$$

1.3.3. CO_2 à l'état de carbonate acide (appelé encore bicarbonate)

90 % du CO_2 sanguin se trouvent sous forme de bicarbonates de sodium ou de potassium ($HCO_3^-Na^+$ et $HCO_3^-K^+$), la majorité étant située dans le plasma. Ces carbonates acides sont synthétisés dans le globule rouge sous l'influence de l'anhydrase carbonique et migrent ensuite dans le plasma.

Le CO_2 total **plasmatique** correspondra donc à :

CO_2 total = HCO_3^- plasmatique + CO_2 dissous (comprenant H_2CO_3) + CO_2 sous forme carbaminée.

2. *Régulation de l'équilibre acidobasique*

Elle fait intervenir successivement deux mécanismes :

- le premier correspond à la **mise en jeu des systèmes tampons.** Ces équilibres chimiques sont d'action quasi instantanée mais sont limités par les concentrations de leurs divers composants.

- Le relai est pris par l'intervention des moyens physiologiques que sont les **poumons** d'abord et les **reins** ensuite. Cette régulation est plus longue à se mettre en œuvre mais est d'une plus grande efficacité et pourra permettre la restauration complète du pH.

Cependant dans un certain nombre de cas, ces systèmes seront débordés et le pH pourra sortir des valeurs de référence.

2.1. Systèmes tampons

Les systèmes tampons de l'organisme les mieux étudiés sont ceux du sang et sont détaillés dans le tableau 2.1 avec leur pourcentage par rapport aux tampons sanguins totaux et leur pK. Le milieu intracellulaire par sa teneur en protéines et l'os par sa richesse en groupements phosphates jouent vraisemblablement un rôle important cependant encore mal connu.

Tableau 2.1 • Systèmes tampons sanguins.

Tampons	pK	% Plasma	% Globules	% total
HCO_3^-/H_2CO_2	6,1	33	10	43
Hémoglobine/Hémoglobinate	7,83			
Oxyhémoglobine/Oxïhémoglobinate	6,60		36	36
Protéines/protéinates	variable	12		12
$H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$	6,8	2	7	9

2.7.7. *Systèmes tampons plasmatiques*

2.1.1.1. *Système acide carbonique-bicarbonates*

C'est quantitativement le plus important des systèmes tampons plasmatiques. Il représente 25 à 30 mmol/1. Ce système est surtout puissant pour lutter contre l'acidose puisque le rapport bicarbonates/acide carbonique est de l'ordre de 20. En présence d'un acide RH nous aurons la réaction :

$$R\text{-}H+ + Na^+HCO_3^- \longrightarrow H_2CO_3 + RNa \longrightarrow CO_2 + H_2O + RNa$$

M.7.2. *Système protéines-protéinates*

II a une action surtout comme moyen de lutte contre l'acidose. Le pouvoir tampon des protéines est du à leurs différents groupements constitutifs. Les résidus d'acides aminés basiques comme l'arginine, l'omithine, la citrulline, la lysine, l'histidine permettent de lutter contre l'acidose en fixant un proton. Au contraire les résidus d'acide aspartique ou d'acide glutamique permettent de lutter contre l'alcalose en libérant un proton. Les protéines plasmatiques représentant environ 70 g/1, leur rôle dans cet équilibre acidobasique n'est pas négligeable.

2.1.1.3. *Système tampon phosphate*

La concentration plasmatique des phosphates inorganiques (Pi) est de l'ordre de 1 mmol/1. C'est dire que ces molécules jouent un rôle plasmatique mineur parmi les systèmes tampons. 85 % des Pi sont, au pH du sang, sous forme de phosphates mono acides disodiques ($PO_4H^=Na_2^+$) ce qui leur permet de fixer un proton pour donner des phosphates diacides monosodiques ($PO_4H_2^-Na^+$). Les 15 % de phosphates diacides peuvent au contraire céder un proton pour lutter contre une alcalose. La réaction globale s'écrit :

$$PO_4H^=Na_2^+ + H^+ \longleftrightarrow PO_4H_2^-Na^+ + Na^+$$

2.1.2. Systèmes tampons globulaires

Les systèmes des bicarbonates **et** des phosphates **jouent un rôle non** négligeable à l'intérieur des globules rouges.

Les systèmes tampons liés à l'hémoglobine sont cependant beaucoup plus importants si l'on se souvient que la quantité d'hémoglobine est de l'ordre de 150 g par litre de sang. Ils interviennent de deux manières différentes :

- grâce au pouvoir de fixation du gaz carbonique sur l'hémoglobine avec **formation de dérivés carbaminés.**

$$HbNH_2 + CO_2 \longrightarrow HbNHCOO^- + H^+$$

- grâce à la réactivité du groupement imidazole des résidus d'histidine capable de fixer les ions H^+.

Au pH du sang l'hémoglobine et l'oxyhémoglobine se comportent comme des acides faibles pouvant se dissocier :

$$HbH \longrightarrow Hb^- + H^+ \qquad pK = 7,83$$
$$HbO_2H \longrightarrow HbO_2^- + H^+ \qquad pK = 6,60$$

L'oxyhémoglobine est donc plus acide que l'hémoglobine.

En fait ces deux dernières réactions sont intriquées (figure 2.2). En effet l'oxyhémoglobine étant un acide plus fort que l'hémoglobine quand l'hémoglobine est **oxygénée au niveau des poumons, elle libère des ions H+.**

$$HbH + O_2 + K^+ \longrightarrow HbO_2^-K^+ + H^+$$

Au niveau des tissus l'oxyhémoglobine est réduite en hémoglobine et celle ci va laisser dans le milieu une base en captant un proton venu de la dissociation de l'acide carbonique.

$$H_2CO_3 \longrightarrow H^+ + HCO_3^-$$
$$HbO_2^-K^+ + H^+ + HCO_3^- \longrightarrow HbH + HCO_3^-K^+ + O_2$$

Au niveau des tissus la concentration élevée en CO_2 et la richesse des acides organiques vont diminuer le pH et cette acidité va permettre la libération de l'oxygène de l'oxyhémoglobine. Cette action du pH sur l'oxygénation de l'hémoglobine (figure 2.1) est appelé « effet Bohr ». A pression partielle d'oxygène (pO_2) égale, par exemple 40 mm de mercure (Hg), la saturation de l'hémoglobine est moindre pour un pH à 7,2 que pour un pH à 7,6.

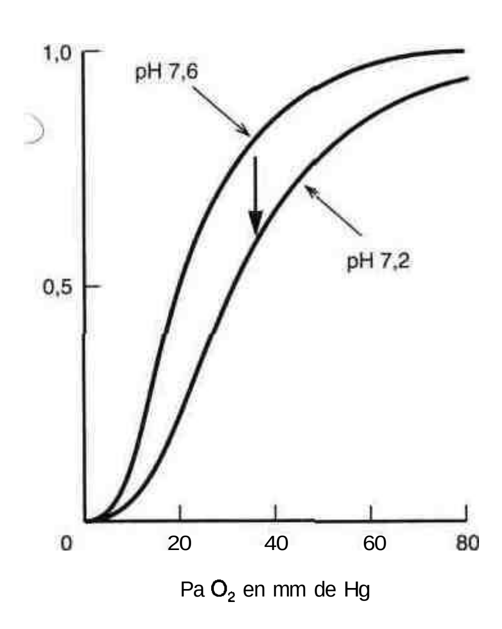


Figure 2.1 • Effet «Bohr».

•2.2. Régulation physiologique du pH

Lors d'un déséquilibre acidobasique, la première ligne de défense est formée par les systèmes tampons, la seconde est la régulation pulmonaire et la troisième st la restauration à long terme par les mécanismes rénaux.

2,2 .1. Régulation pulmonaire

2.2.1.1. Centre respiratoire bulbaire

Ce centre est sensible à la variation de la concentration en protons du sang c'est-à-dire au pH. Une diminution du pH va entraîner une augmentation du rythme et de l'amplitude respiratoires de façon à éliminer le CO_2 en excès. L'augmentation du pH qui en résulte freinera la stimulation bulbaire. Réciproquement une augmentation du pH sera responsable d'une diminution du rythme et de l'amplitude respiratoires. Dans ce dernier cas la reaction pulmonaire doit rester compatible avec une oxygénation correcte du sang.

A un moindre degré interviennent des chémorecepteurs aortiques et carotidiens sensibles à la pO_2 sanguine et qui stimulent le centre bulbaire. Une diminution de la pO_2 sera par exemple responsable d'une hyperventilation.

Les caractéristiques de cette régulation pulmonaire sont une mise **en œuvre** rapide et une grande sensibilité aux variations du pH.

Cependant son efficacité est limitée car l'hyperventilation ne peut être augmentée indéfiniment et l'hypoventilation doit rester compatible avec la vie. De

plus les poumons n'interviennent que sur la composante acide du système bicarbonate/acide carbonique.

*2.2.1.2. **Les** échanges gazeux dans l'organisme*

▶ AU NIVEAU TISSULAIRE

Les tissus de par leur métabolisme fabriquent une grande quantité de CO_2 qui doit être pris en charge et éliminé au niveau des poumons. Les globules rouges (figure 2.2), à ce niveau tissulaire, arrivent chargés d'oxyhémoglobine.

Le CO_2 tissulaire, après avoir été dissous dans le plasma, va pénétrer dans le globule rouge :

- une petite quantité de ce gaz se fixe sur l'oxyhémoglobine pour constituer un carbamate en libérant l'oxygène.
- la plus grande partie du CO_2 réagit avec de l'eau pour former en présence de l'anhydrase carbonique, dont le globule rouge est riche, de l'acide carbonique. L'acide carbonique se décompose immédiatement en H^+ et HCO_3^-. Cet afflux de protons fait baisser le pH entraînant la libération de l'oxygène de l'oxyhémoglobine. Les ions H^+ se fixent alors sur l'hémoglobine laissant les ions bicarbonates dont un grand nombre va sortir de la cellule permettant à autant de chlorures de pénétrer. Cet échange bicarbonate/chlorure est appelé « effet Hamburger ».

Le CO_2 tissulaire a donc été transformé en bicarbonates dont le plus grand nombre ne reste pas dans le globule rouge et sera transporté par le plasma vers les poumons (ou les reins) pour son élimination.

▶ AU NIVEAU PULMONAIRE

Les globules rouges arrivent ici chargés de déoxyhémoglobine (HbH) et pour une petite part de carbaminohémoglobine. L'oxygène de l'alvéole pulmonaire, après s'être dissous dans le plasma pénètre dans le globule rouge :

- une petite partie se fixe sur la carbaminohémoglobine libérant alors le CO_2.
- la part la plus importante vient se fixer sur l'hémoglobine libérant alors un proton (rappelons que l'oxyhémoglobine est plus acide que l'hémoglobine). Ce proton, en présence d'un bicarbonate plasmatique échangé contre un chlorure, se retrouve sous forme d'acide carbonique qui se dissocie immédiatement en CO_2 et FLD. Le gaz carbonique est alors éliminé dans l'air alvéolaire après avoir été dissous dans le plasma.

Le poumon est ainsi capable d'éliminer normalement 20 moles de gaz carbonique par jour.

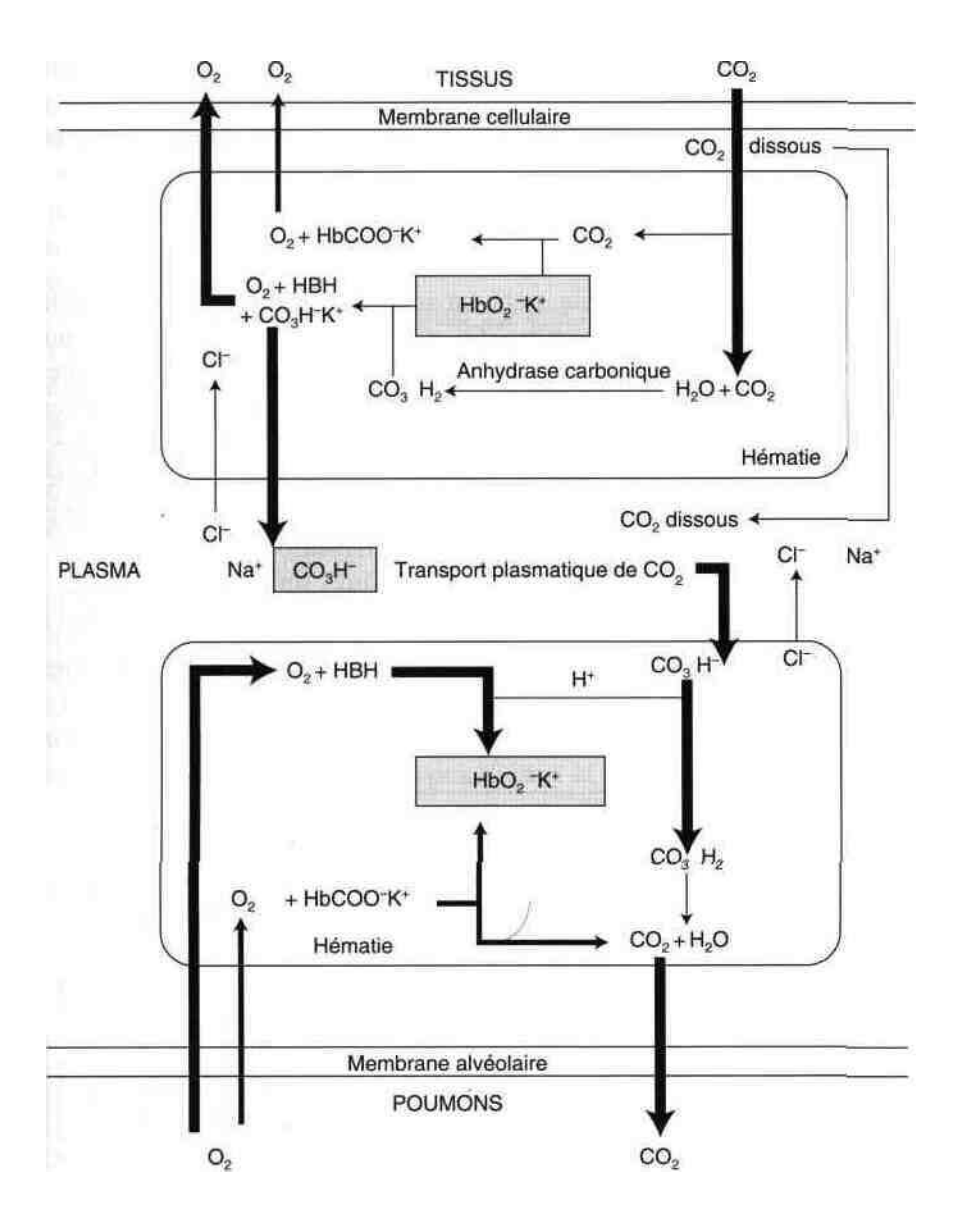


Figure 2.2 • Schéma des échanges respiratoires.

2.2.2. *Régulation rénale*

Elle est plus longue à réagir en cas de perturbations car elle intervient en troi- position. Cependant elle peut durer plus longtemps et représente un o très efficace de lutte aussi bien contre l'acidose que contre l'alcalose. ;lons que l'on peut considérer l'urine primitive comme un ultrafiltrat du plasma sanguin. Le rôle du rein sur l'équilibre acido-basique est double :

- il peut réabsorber la quasi totalité des bicarbonates filtrés, ou bien excréter **ceux ci** en cas de surcharge alcaline,
- il peut éliminer des ions H4" en générant des bicarbonates qui seront absorbés.

2.2.2.1. Réabsorption ou excrétion des bicarbonates

La cellule tubulaire proximale, riche en anhydrase carbonique, peut synthétiser de l'acide carbonique à partir de CO_2 et d'ELO. Celui-ci se dissocie immédiatement (figure 2.3) en protons et en bicarbonates. L'ion H"1" est échangé contre un ion Na^+ de l'urine primitive laissant le bicarbonate qui sera réabsorbé. Dans l'urine l'ion H1" se combinera avec un bicarbonate pour former un acide carbonique qui se dissocie immédiatement en CO_2 et eau. Ce CCL sera réabsorbé et participera à la réaction catalysée par l'anhydrase carbonique. On peut donc dire qu'à un bicarbonate filtré correspond un bicarbonate réabsorbé.

Normalement plus de 90 % des bicarbonates filtrés sont ainsi réabsorbés.

La réabsorption des bicarbonates dépend en particulier de la pCO_2 dont une élévation entraîne une réabsorption accrue et réciproquement.

C'est aussi à ce niveau qu'est reabsorbé en totalité le potassium filtré.

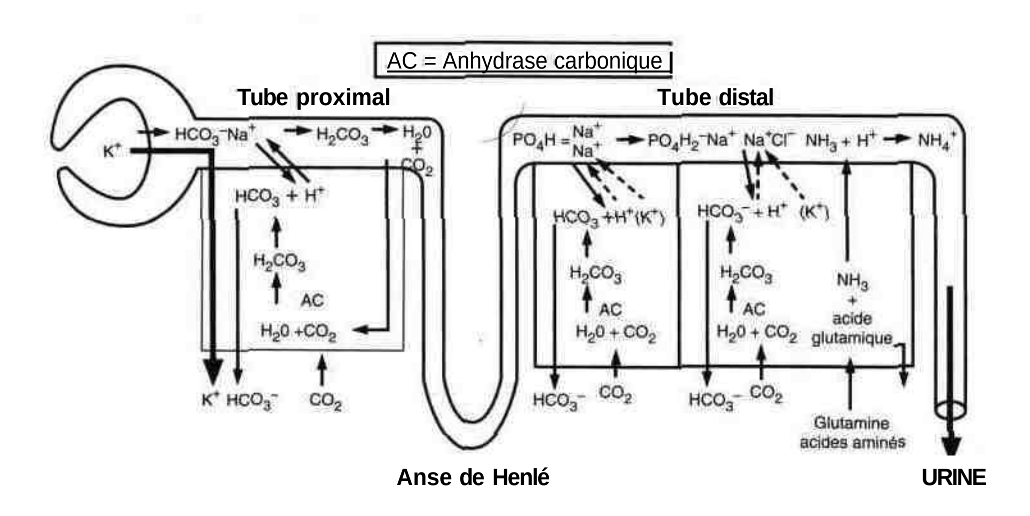


Figure 2.3 • Rôle du rein dans l'équilibre acidobasique

2.2.2.2. *Élimination d'ions H^+*

Elle se déroule au niveau du tube contourné distal où la cellule rénale, riche ici aussi en anhydrase carbonique, élimine un proton en l'échangeant contre un ion sodium. Le bicarbonate généré est ensuite réabsorbé dans le sang. La réabsorption du sodium est sous le contrôle de **l'aldostérone.**

A ce niveau existe une compétition entre un ion H^+ et un ion K^+ dans l'échange avec l'ion sodium réabsorbé : si un H^+ est éliminé un ion K^+ est retenu et réciproquement.

- Ces ions H^+ peuvent se fixer sur des **phosphates monoacides** pour donner des phosphates diacides. Il s'agit de ce que l'on appelle l'acidité titrable qui est définie comme la quantité de soude 0,1 N nécessaire pour ramener le pH urinaire au pH plasmatique.
- Les ions H^+ peuvent se fixer aussi sur une molécule **d'ammoniac (NH_3)**, issue de la glutamine ou de certains autres acides aminés, pour former un ion ammonium NH_4^+ qui, très peu diffusible, ne sera pas réabsorbé.

La compétition dans l'échange contre un ion sodium, d'un proton ou d'un ion potassium, est responsable de l'interaction du métabolisme du potassium avec l'équilibre acido-basique. Cette interaction rénale est complétée par une dépendance des deux métabolismes au niveau cellulaire (figure 2.4).

- En cas d'excès d'ions H^+ ceux ci sont éliminés préférentiellement par le rein à la place d'ions potassium et de plus pénétreront dans les cellules faisant sortir le potassium. **Une acidose sera génératrice d'hyperkaliémie et réciproquement**
- En cas de déficit en ions H^+ le potassium sera éliminé préférentiellement au niveau rénal et les ions H^+ sortiront des cellules en échange avec des ions K^+. **Une alcalose sera génératrice d'hypokaliémie et réciproquement.**

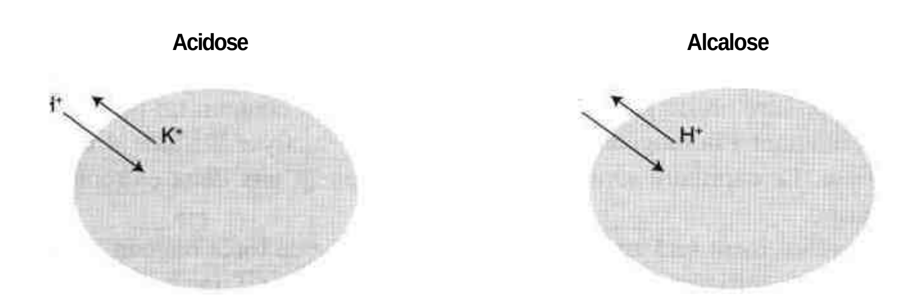


Figure 2.4 • Échanges cellulaires au cours des perturbations de l'équilibre acido-basique.

3. *Exploration biochimique*

3.1. Prélèvement

▶ DOSAGE PLASMATIQUE OU SÉRIQUE SUR SANG VEINEUX

Beaucoup d'automates déterminent, à côté de nombreux autres constituants plasmatiques, les bicarbonates ou le CO_2 total :

- les bicarbonates peuvent être mesurés par une méthode colorimétrique (presque abandonnée aujourd'hui) ou par une méthode enzymatique ;
- le CO_2 total est le plus souvent mesure par une méthode électrométrique après que l'ensemble du CO_2 plasmatique (bicarbonates compris) ait été libéré par un acide.

Dans ces conditions le prélèvement est effectué normalement sur sang veineux et la deuxième méthode donne des résultats légèrement plus élevés que la première.

▶ SANG ARTÉRIEL

Une véritable exploration des gaz du sang, appelée généralement « gazométrie » mesure le **pH, la pCO_2, la pO_2**. Dans ces conditions le prélèvement doit être artériel ce qui permettra d'apprécier en particulier l'hématose (l'oxygénation du sang).

Le patient doit être au repos pour éviter les effets d'une hyperventilation de stress, et la ponction se fait au niveau d'une artère (fémorale, humérale...).

Chez le nourrisson une microméthode peut être pratiquée, et si l'accès artériel est délicat, une ponction capillaire périphérique sera préférée (au niveau d'un doigt, du lobe de l'oreille, ou du talon après dilatation vasculaire par massage ou chaleur).

Dans tous les cas, le sang est prélevé sûr héparine, sans introduction de bulle d'air, homogénéisé par retournement, et maintenu en anaérobiose stricte jusqu'à son analyse. On pourra noter la température du patient ce qui permettra de faire d'éventuelles corrections. Le matériel le plus fréquemment utilisé est la seringue héparinée, maintenue hermétique après ponction par un bouchon.

Le capillaire utilisé pour une microméthode devra contenir un petit barrau en fer permettant l'homogénéisation du sang avant analyse à l'aide d'un aimant extérieur. Le capillaire sera bouché hermétiquement aux deux extrémités avec du mastic.

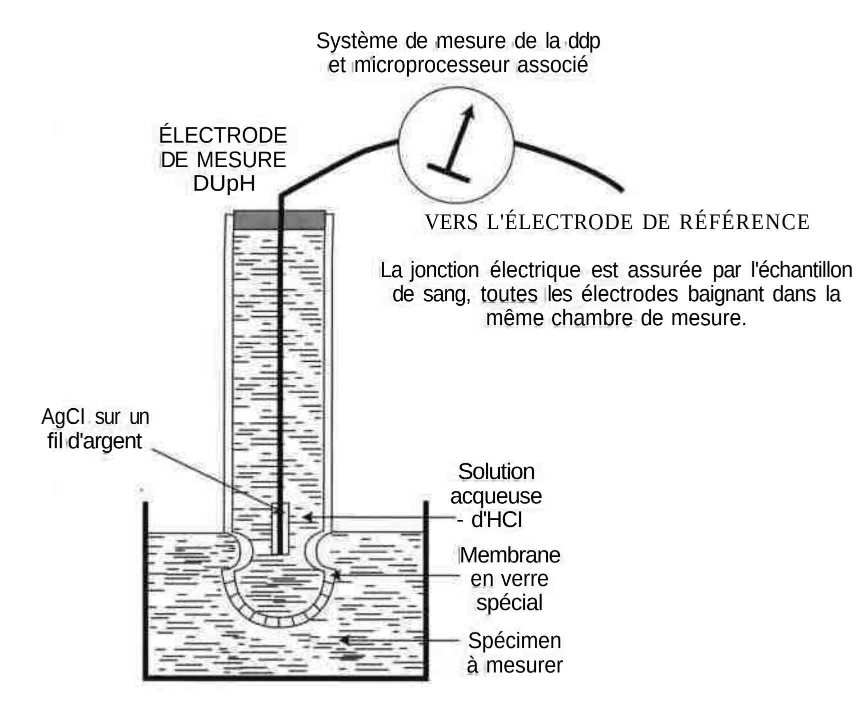
Le prélèvement sera analysé **sans délai,** et en cas de force majeure, devra être maintenu au réfrigérateur à + 4°C pendant un maximum d'une heure.

3.2. Mesures de trois paramètres : pH, *POy* PCO_2

Bien que la mesure soit effectuée sur sang total, les électrodes sélectives utilisées sont sensibles aux éléments contenus dans l'eau plasmatique et les résultats sont donc ceux du plasma et non du sang total.

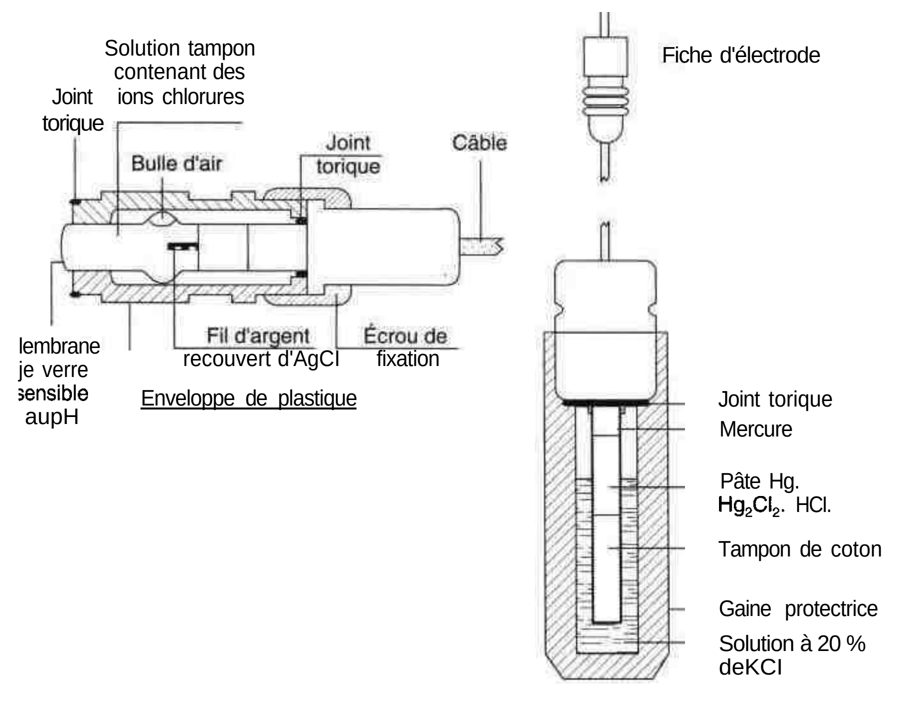
3.2.1. Mesure du pH

Elle est faite à l'aide d'une électrode de verre schématisée dans la figure 2.5 thermostatée à 37 °C et miniaturisée (figure 2.6). La différence de potentiel est obtenue par rapport à une électrode de référence.



1

Figure 2.5 • Électrode de verre pour la mesure du pH associée à une électrode de référence.



[redacted]gure 2.6 Électrode de mesure du pH et de référence (Société Radiometer, Copen-•ague).

*3.2.2. Mesure de la **pO_2***

La pO_2 est mesurée par une méthode polarographique utilisant l'électrode de Clark dont le principe est donné dans la figure 2.7 et un exemple de commercialisation dans la figure 2.8.

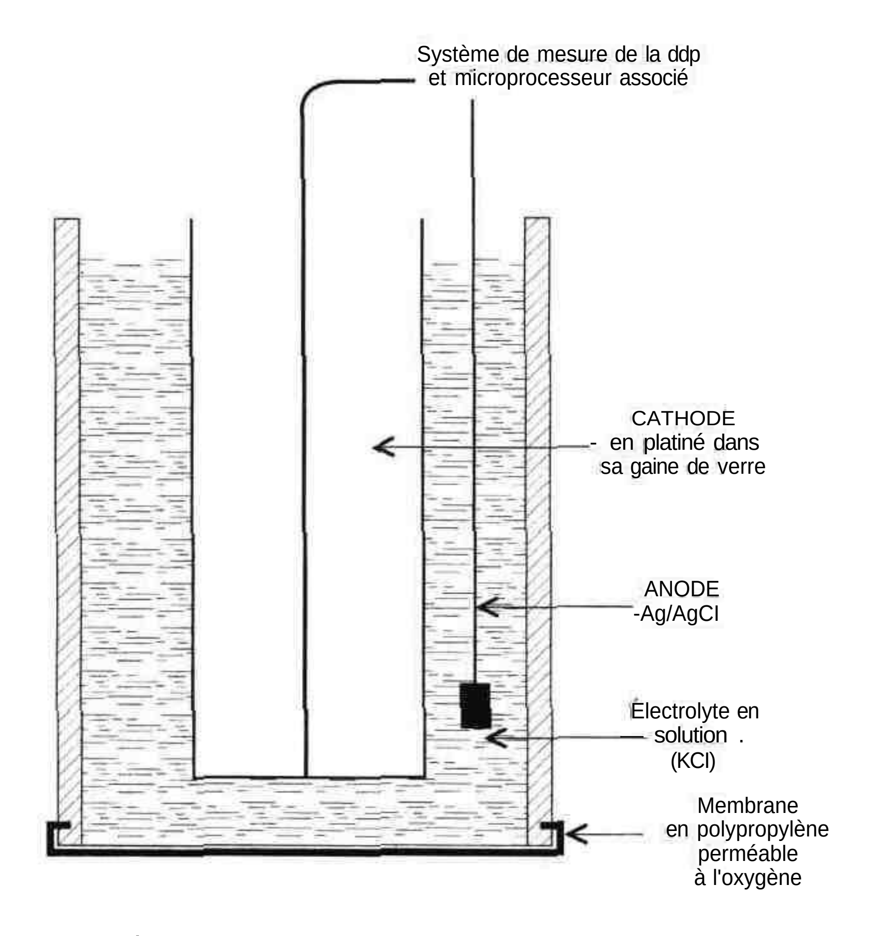


Figure 2.7 • Électrode de Clark

Les valeurs physiologiques sont :

70 à 95 mmHg sang A	soit **9,31 à 12,63 kPa**
37 à 40 mmHg sang V	**soit** 4,92 à 5,32 **kPa**

II faut noter que la pO_2 artérielle diminue avec l'âge et avec l'altitude.

Age (en années)	pO_2 (mmHg) moyenne et extrêmes	
20-29	94	(84-104)
30-39	91	(81-101)
40-49	88	(78-98)
50-59	84	(74-94)
60-69	81	(71-91)

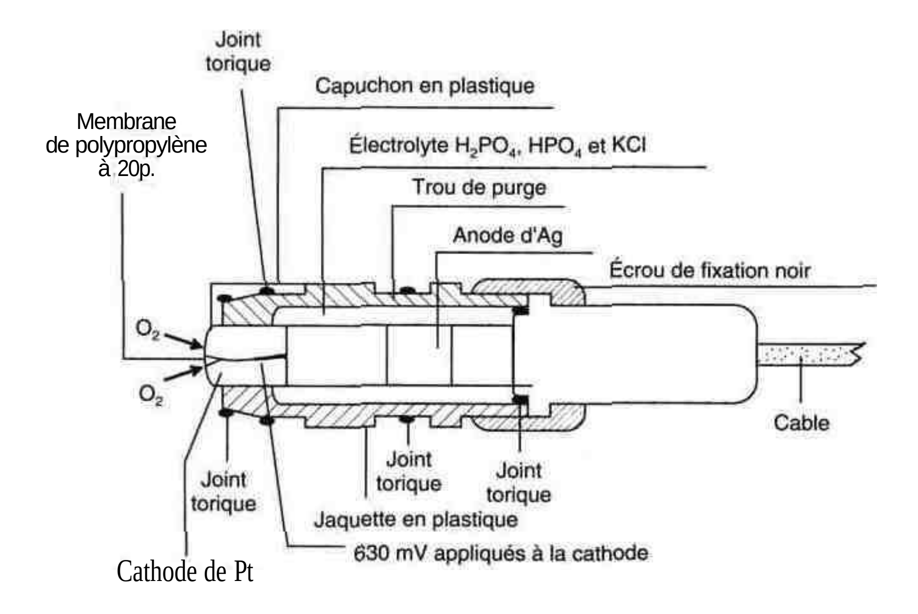


Figure 2.8 • Électrode de mesure de la **pO_2**.
(Société Radiometer Copenhague.)

Le principe de la mesure de la **pO_2** est basé sur le fait qu'une électrode soumise à un potentiel de polarisation constant (0,6 volt) fournit un courant directement proportionnel à la **pO_2** diffusant au niveau de la surface de réaction de l'électrode. Ce courant est produit par la réduction de l'**O_2** au niveau de la cathode (fil de platine).

$$O_2 + 2H_2O + 4e^- \longrightarrow 4\ OH^-$$

L'alimentation en électrons à la cathode, est assurée par une anode en argent chloruré (Ag/AgCl).

$$Ag \longrightarrow Ag^+ + e^-$$

Le débit d'électrons consommés est proportionnel à la pO_2 présente.

L'électrode est recouverte d'une membrane de polypropylène perméable aux gaz et à l'O_2 ce qui la rend spécifique. Il faut la changer tous les 20 à 30 jours. Sur les nouveaux appareils, les électrodes sont jetables. La détérioration de la membrane se reconnaît par une diminution de la sensibilité et une instabilité.

La pO_2 mesurée est directement en rapport avec l'O_2 dissous dans le sang et non avec l'O, combiné à l'hémoglobine. Au cours d'une asphyxie à l'oxyde de carbone, dans laquelle l'hémoglobine n'est plus apte à transporter l'oxygène, la pO_2 peut être normale.

La pO_2 est très sensible aux variations de température. Il faut bien thermostater l'électrode et tenir compte de la température du sujet. Si le prélèvement a été conservé à + 4°, réchauffer rapidement celui-ci à température ambiante avant le dosage. •

3.2.3. Mesure de la pCO_2

Elle est faite grâce à l'électrode de Severinghaus (figure 2.9) dont un exemple de commercialisation est donné dans la figure 2.10.

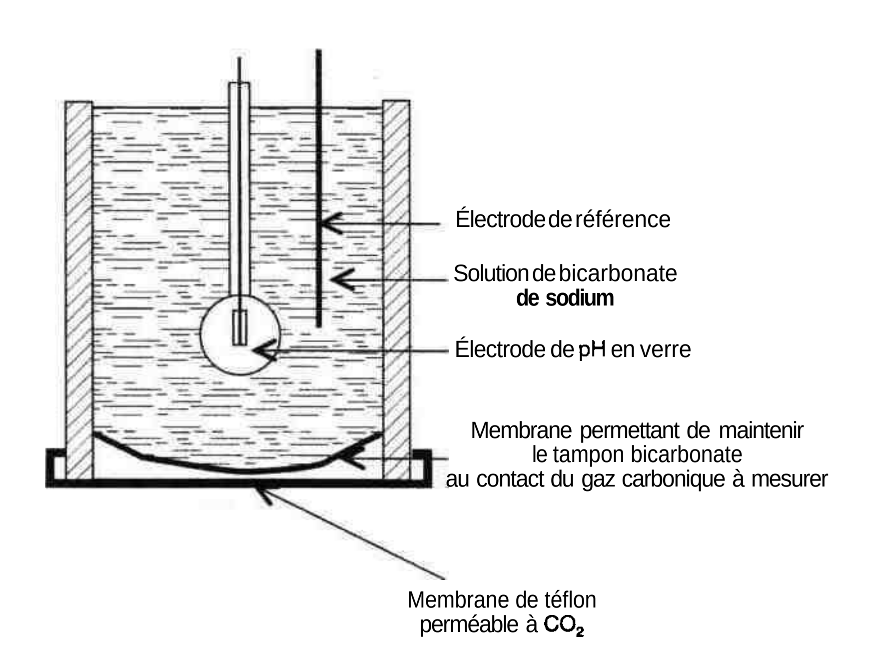


Figure 2.9 • Électrode de Severinghaus : le CO_2 du spécimen fait varier le pH de la solution de bicarbonate mesuré *paf* l'électrode de verre.

Valeurs physiologiques = **35 à 44 mmHg sang A soit 4,65 à 5,85 kPa**
42 à 48 mmHg sang V soit 5,58 à 6,38 kPa

La mesure de pCO_2 se ramène à une mesure de pH. Par méthode électrométrique, on mesure les variations de pH d'une solution de bicarbonates séparée du sang par une fine membrane en téflon (ou silicone) perméable au CO_2 uniquement. La diffusion du CO_2 entraîne un abaissement du pH qui est proportionnel à la quantité de CO_2 présent. L'électrode est composée d'une électrode de mesure de pH en verre et d'une électrode de référence miniaturisée. Le CO_2 de l'échantillon diffuse à travers la membrane puis se dissout dans l'électrolyte.

$$CO_2 + H_2O \longrightarrow H_2CO_3$$
$$H_2CO_3 \longrightarrow H^+ + HCO_3^-$$

L'augmentation de H"*" fournit un potentiel variant logarithmiquement avec la pCO_2.

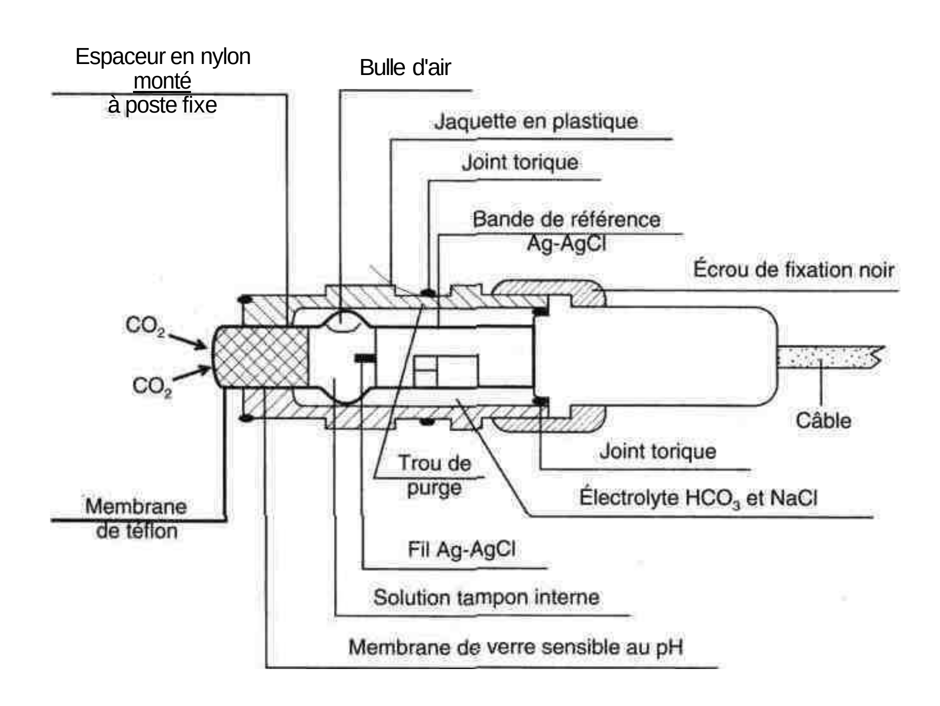


Figure 2.10 • Electrode de mesure de la pCO_2.
(Société Radiometer Copenhague.)

3.3. Calcul des autres paramètres

Les appareils modernes permettent, à partir d'abaques mises en mémoire, de **calculer** un certain nombre de paramètres supplémentaires. Certains demandent la connaissance de la concentration en hémoglobine qui est souvent directement mesurée par l'appareillage, mais qui parfois sur d'autres types de matériel doit être introduite dans le calculateur si elle est connue. Si elle n'est pas connue il est possible de donner une valeur forfaitaire.

3.3.1. Concentration en bicarbonates

C'est la concentration des ions HCO_3^- en mmol/1 de plasma qui est déduite par le calcul de la mesure de pCO_2 et du pH à l'aide de l'équation d'Henderson Hasselbalch.

$$(HCO_3^-) = a \times 10^{-pK} \times pCO_2 \times 10^{pH}$$

a = coefficient de solubilité du CO_2

Valeurs normales **: 22 à 26 mmol/1.**

Différentes méthodes, par méthode enzymologique ou potentiométrie sur automates effectuant l'ionogramme permettent de doser directement les bicarbonates (cf. chapitre 1 Équilibre hydroélectrolytique).

3.3.2. Bicarbonates standard

C'est la concentration plasmatique en bicarbonates (mmol/1) qu'aurait le sang de ce patient s'il était équilibré à une pCO_2 de 40 mmHg et à 37 °C.

Valeurs normales : **24 mmol/1 ± 2 mmol/1.**

3.3.3. Concentration en CO_2 total

C'est la quantité totale de CO_2 plasmatique que ce spécimen possède. Elle correspond au CO_2 qui pourrait être extrait de ce plasma en présence d'un acide **fort.**

$$CO_2 \text{ total} = apCO_2 + H_2CO_3 + (HCO_3^-) + CO_2 \text{ combiné}$$

Valeurs normales : 25 **mmol/1.**

3.3.4. Bases tampons

C'est la somme des concentrations en mmoles des anions tampons **d'un litre de sang total** [(HCO_3^-), protéines, hémoglobine, phosphates].

Valeurs normales **: 46 à 48 mmol/1.**

3.3.5. Excès de base

C'est la différence entre la valeur des bases tampons calculée du sujet étudié et celle des bases tampons d'un individu normal (47 mmol/1).

Valeurs normales : **0 ± 2mmol/l.**

Même négative cette expression s'appelle « excès de base ».

3.3.6. *Saturation en O_2*

La majeure partie de l'O_2 sanguin est fixée sur l'hémoglobine.

La capacité en O_2 à l'état combiné du sang est la plus grande quantité d'oxygène qui peut être fixée par le pigment. **Le** contenu en O_2 est la quantité d'oxygène réellement fixée par l'hémoglobine.

Le rapport : Hb oxygénée/Hb oxygénable = Saturation en O_2 (SaO_2).

Valeurs normales **: 95 à 98 %.**

3.4. Représentation graphique : diagramme de Davenport

De nombreux diagrammes ont été proposés pour aider à l'interprétation des résultats. L'un des plus classiques est celui de Davenport (figure 2.11).

Ce diagramme exprime la concentration des bicarbonates en fonction du pH.

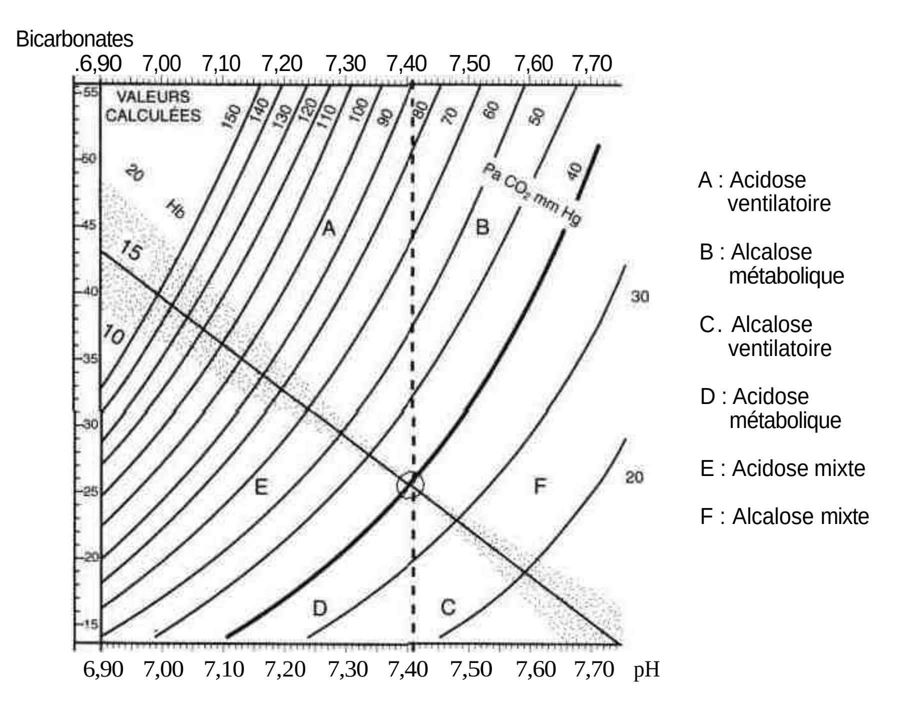


Figure 2.11 • Diagramme de Davenport.

Il existe 2 lignes importantes sur ce diagramme :

- la ligne tampon normale (ligne droite oblique) correspond aux différentes valeurs de la concentration en bicarbonates et de leur pH correspondant, d'un sang total équilibré à différentes pressions partielles de CO_2 ;

- la ligne isobare $paCO_2$ = 40 mm de Hg est expérimentalement déterminée en calculant avec l'équation d'Henderson Hasselbaich le taux des bicarbonates en fonction de la valeur du pH pour une pCO_2 de 40 mm Hg.

Ces deux lignes définissent, avec la verticale du pH normal, 6 secteurs correspondant aux différentes perturbations rencontrées (A à F).

4. *Déséquilibres acidobasiques*

La connaissance de l'équation d'Henderson Hasselbaich rappelée ci-après :

$$pH = 6.1 + \log \frac{(HCO_3^-)}{a pCO_2}$$

permet de voir que le pH est directement lié à la valeur du rapport

$$\frac{(HCO_3^-)}{a \times pCO_2}$$

Les bicarbonates du numérateur sont **d'origine métabolique** et sont liés à la *fonction rénale.*

La pCO_2 du dénominateur est **d'origine respiratoire** et est liée à ***la fonction pulmonaire.***

Les variations du pH peuvent être la conséquence :

- d'une **diminution des bicarbonates** responsable d'une ***acidose métabolique ;***
- d'une **augmentation des bicarbonates** responsable d'une ***alcalose métabolique*** **;**
- d'une **diminution de la pCO_2** responsable d'une ***alcalose respiratoire*** **;**
- d'une **augmentation de la pCO_2** responsable d'une ***acidose respiratoire.***

En cas de perturbation de la valeur du pH l'organisme met en jeu un système de compensation qui a pour but de ramener le rapport HCO_3^-/a x pCO_2 à une valeur normale.

- En cas d'acidose métabolique la compensation se fera par une diminution de la pCO_2.
- Une alcalose métabolique sera compensée par une augmentation de la pCO_2.
- Une acidose respiratoire par une augmentation des bicarbonates.
- Une alcalose respiratoire par une diminution des bicarbonates.

Un pH qui est en dehors des valeurs de référence correspond à une perturbation décompensée.

Si malgré le déséquilibre acido-basique le pH est maintenu à l'intérieur des valeurs de référence on dira que la perturbation est compensée.

4.1. Acidose métabolique

Elle correspond à un trouble du métabolisme dû à l'accumulation d'acides (anions indosés ou trou anionique) ou à une perte excessive de bases.

Elle se caractérise par une diminution des bicarbonates plasmatiques et donc une baisse du pH.

4.1.1. Etiologies

II s'agit habituellement de surcharges en acides avec augmentation du trou anionique.

Trou anionique : (Na^+ + K+) - (Prot + Cl- + CO_3 H- + 2) > 5 **mEq/1.**

Les surcharges en acides sont dans la plupart des cas d'origine endogène.

4.1.1.1. Augmentation des corps cétoniques

La cétonémie normale doit être inférieure à **0,6 mmol/1.**

- *L'jacidocétose diabétique* est due à une production excessive de corps cétoniques (acide acétoacétique et acide (3-hydroxybutyrique) provoquée par l'utilisation hépatique d'un excès d'acétyl CoA provenant de l'oxydation des acides gras. L'abaissement du taux de HCO_3^- peut descendre jusqu'à 5 mmol/1 avec une menace vitale immédiate. C'est le coma métabolique le plus fréquent.

- *Le jeûne prolongé* provoque aussi une augmentation des acides acétoacétique et (3-hydroxybutyrique.

4.1.1.2. Acidose lactique

Le taux normal d'acide lactique est de 1 à **1,7 mmol/1.**

Le taux normal de l'acide pyruvique est de **0,05 à 0,07 mmol/1.**

L'acidose lactique est la conséquence habituelle d'une anoxie cellulaire au cours des *états de choc sévère.* Elle peut être retrouvée dans le cadre d'une circulation extracorporelle. Elle est observée également en cas *d'exercice musculaire intense,* dans les *états de mal épileptique, dans les cirrhoses, dans les pancréatites, les leucoses aiguës.* Elle peut être d'origine toxique, à la suite de la prise de biguanides (traitement du diabète gras).

Les acidoses lactiques par défaut de certaines enzymes sont rares avec des

origines diverses (maladie de Von Gierke avec déficit en glucose 6 phosphatase, déficit en fmctose diphosphatase, de glycogène synthétase... été).

4.1.1.3. Acidose rénale par atteinte rénale

Lorsque la clairance de la créatinine est inférieure à 0,5 ml/s, l'acidose est constante avec augmentation modérée des indosés anioniques. En cas d'hypovolémie l'insuffisance rénale fonctionnelle qui en résulte peut être responsable d'une acidose métabolique. La diminution de la filtration glomérulaire entraîne une rétention des acides produits par le catabolisme protidique.

4.1.1.4. Apports d'acides exogènes

On les observe au cours des intoxications :

- par l'éthylène glycol, le méthanol, les salicylés... ;
- par apport excessif de chlorure d'ammonium, de chlorhydrate d'arginine, de lysine ou de méthionine utilisés dans le traitement des alcaloses.

4.1.1.5. Pertes de bicarbonates

Elles peuvent résulter :

- De pertes par voie digestive, d'origine surtout iléale et colique (diarrhées profuses).
- De pertes par voie rénale :

Dans l'acidose tubulaire proximale avec urines riches en HCO_3^- il y a défaut de réabsorption du HCO_3^- au niveau du tubule proximal. Certains diurétiques tels que les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (Acétazolamide) peuvent être responsables d'une acidose métabolique.

Dans l'acidose tubulaire distale il y a défaut de sécrétion distale d'ions H"1".

4.1.2. Compensation physiologique

La compensation respiratoire, ayant pour but la baisse de la pCO_2, intervient rapidement dans les minutes qui suivent. Elle est déclenchée par la baisse de pH notée par les chémorécepteurs périphériques qui provoquent une stimulation du centre respiratoire jusqu'à une réduction importante de pCO_2 :

La respiration qui en résulte a pour caractéristiques un rythme accéléré avec une amplitude augmentée et peut se traduire au maximum par la **respiration de Kussmaul** (respiration profonde et ample, égale aux deux temps et séparés par une pause : respiration en créneau).

La compensation respiratoire, bien que très efficace, reste partielle pour des raisons de limitations anatomiques, physiologiques et biochimiques (le travail musculaire lié à la respiration est lui-même générateur d'acides).

Dans ces conditions c'est le système tampon des bicarbonates qui est mis lar-

gement à contribution et il y a une baisse considérable de ceux-ci. Le rein va ainsi contribuer à ramener le pH vers les valeurs de référence.

La compensation rénale va se faire par l'augmentation de l'élimination des ions H+ avec augmentation de l'acidité titrable de l'urine et de l'ammoniurie. Bien sûr le rein doit être fonctionnel.

En cas d'acidose métabolique intense, **au** cours d'un coma acido-cétosique par exemple, les possibilités d'élimination rénale des ions $H^{4'}$ peuvent être dépassées et l'organisme perd des quantités importantes de sodium et de potassium (pas d'échange avec les ions $H^{'1''}$). De plus la perte hydrique caractéristique de ce syndrome entraîne une hypovolémie responsable d'une insuffisance rénale fonctionnelle qui va aggraver l'acidose.

4.1.3. Tableau clinique

Deux formes peuvent être différenciées :

- les formes légères qui sont soit asymptomatiques soit associées à une asthénie et des nausées.

- les **formes graves** qui présentent une hyperpnée avec respiration profonde (rythme de Kussmaul).

L'acidose peut aboutir à un état de choc, obnubilation et coma.

4.1.4. Tableau biologique

L'analyse des gaz du sang et du bilan électrolytique présente différentes perturbations :

- Le pH sanguin artériel < 7,35 sauf s'il y a compensation.
- Les bicarbonates sont très diminués : < 15 mmol/1.
- La pCO_2 et le CO_2 total sont très diminués du fait de la compensation.
- Un trou anionique est toujours présent dans les acidoses par perte de HCO_3^-. Il est très important dans l'acidocétose et l'acidose lactique.
- La kaliémie est augmentée par échanges cellulaire et rénal entre $K^{''1''}$ et $H^{'1''}$; ainsi un pH à 7,20 entraîne une kaliémie de 7 mmol/1.
- La kaliémie peut être normale dans l'acidose tubulaire proximale par perte rénale de K^+ ou au cours des diarrhées qui se traduisent par une perte digestive deK+.
- La compensation rénale est efficace s'il y a augmentation de l'acidité urinaire et des ions NH_4^+.

Après décompensation la situation de l'état acido-basique du sujet apparaît dans le quadrant D inférieur gauche du diagramme de Davenport.

4.1.5. Traitement

Le traitemenfest étiologique.

La réanimation d'une acidose s'effectue le plus souvent dans le cadre de l'urgence avec perfusion d'alcalinisants et hydratation, et si nécessaire épuration extra-rénale.

4.2. Acidose respiratoire

Elle correspond à une diminution de l'élimination du CO_2 avec **augmentation de la pCO_2** (hypercapnie) et diminution du pH sanguin.

4.2.1. Étiologies

4.2.1.1. Diminution des mouvements de la cage thoracique

Les principales causes sont :
- *une atteinte de la paroi* par des traumatismes ;
- *une atteinte nerveuse ou musculaire* par dystrophies musculaires, myasthénie, poliomyélite ou curarisants.

4.2.1.2. Diminution de la surface alvéolaire disponible

Les pathologies au cours desquelles cette diminution peut être rencontrée sont les suivantes :
- les *bronchopneumopathies chroniques* obstructives **par emphysème ou** asthme ;
- les *bronchopneumopathies restrictives* par fibrose pleurale ou pulmonaire, pneumothorax ou œdème aigu du poumon ;
- la *mucoviscidose* dans laquelle est retrouvée une dilatation des bronches avec hypersécrétion bronchique.

4.2.1.3. Hypoventilation par inhibition des centres respiratoires

Dans ce cadre sont retrouvés :
- un accident vasculaire cérébral ;
- une hypotension intracrânienne ;
- une atteinte bulbaire par anesthésiques, morphiniques, tranquilisants, barbituriques ou alcool.

4.2.1.4. Air vicié par augmentation du CO_2 (caves, grottes...)

4.2.1.5. Insuffisance respiratoire aiguë avec hypoxémie aiguë et détresse respiratoire (cause toxique, médicamenteuse, traumatique).

Il est important de distinguer le caractère aigu ou chronique des acidoses respiratoires.

4.2.2. Compensation physiologique

La compensation sera rénale par une augmentation de la réabsorption des bicarbonates et élimination des ions **H^{4}"** (l'augmentation de la pCCL augmente la

concentration d'acide carbonique générateur d'ions H[1]"). Ce mécanisme ayant une inertie relativement importante l'augmentation des bicarbonates n'apparaîtra qu'au bout de quelques jours, permettant de faire la différence entre une acidose respiratoire aiguë à bicarbonates normaux et une acidose chronique à bicarbonates augmentés.

Dans ces conditions la compensation est lente mais efficace.

Si le taux des bicarbonates ne peut suivre l'élévation de la pCO_2 le pH diminue et l'acidose est décompensée. Les acidoses aiguës sont assez mal compensées alors que les acidoses chroniques sont bien compensées.

4.2.3. Tableau clinique

Le patient présente des céphalées, une cyanose lorsqu'il y a hypoxie associée, une confusion, une somnolence pouvant aboutir à un coma. L'acidose est grave dans les formes aiguës où l'augmentation de la pCO_2 est mal compensée avec chute brutale du pH./

1

4.2.4. Tableau biologique

Les examens sanguins et urinaires montrent :

- Un pH artériel d'autant plus diminué que l'atteinte est aiguë,
- Une pCO_2 augmentée.
- Des bicarbonates augmentés et des chlorures abaissés.
- Une pO_2 très diminuée.

La pO_2 basse est un signe d'insuffisance respiratoire plus discriminant que l'augmentation de la pCO_2. En effet, le CO_2 diffuse beaucoup mieux à travers la membrane alvéolocapillaire et certaines insuffisances respiratoires ont une pCO_2 normale mais une pO_2 diminuée.

- Le pH urinaire est très diminué et l'ammoniurie augmentée si le rein compense.

Après décompensation la situation de l'état acidobasique du sujet apparaît dans le quadrant supérieur gauche A du diagramme de Davenport.

4.2.5. Traitement

Des analeptiques respiratoires peuvent être prescrits associés ou non à une ventilation assistée. Une trachéotomie peut parfois être pratiquée.

L'oxygénothérapie est à administrer avec précaution chez les insuffisants respiratoires car la stimulation centrale due à l'hypercapnie est alors diminuée.

Les inhibiteurs de l'anhydrase carbonique (acétazolamide), qui s'opposent à la réabsorption de HCO_3^-, sont dangereux car ils entraînent une décompensation rapide chez l'insuffisant respiratoire.

4.3. Alcalose métabolique

Elle est peu fréquente. Elle est due à une alcalinisation provoquée par un **excès de bicarbonates** ou **une perte d'ions H"1'.**

4.3.1. Étiologies

4.3.1.1. Pertes digestives d'ions H^+

Elles sont provoquées :

- *par des vomissements* dus à une sténose du pylore ou à une obstruction au niveau du grêle proximal (occlusion) ;
- *par une aspiration gastrique.*

4.3.1.2. Pertes rénales d'ions-ff'

Elles sont la conséquence :

- *d'une déplétion chlorurée* par utilisation de certains diurétiques (Furosémide). Ceux-ci inhibent la réabsorption des chlorures au niveau de l'anse de Henlé. Cette inhibition a pour conséquence une non reabsorption du sodium à ce niveau (maintien de l'équilibre anions-cations). L'afflux de sodium au niveau du tubule rénal entraine sa réabsorption éliminant des ions H1' et des ions K"1" ;
- *de certains hypercorticismes :*
  dans le cadre d'un syndrome de Cushing primitif ou iatrogène ;
  dans l'hyperaldostéronisme primitif (syndrome de Conn) ou secondaire ;
- *de l'ingestion excessive* ***de*** *substances à effet minéralocorticoïde* (acide glycyrrhizique de la réglisse).

4.3.1.3. *Charges en alcalins supérieures aux possibilités d'excrétion rénale*

Elles sont rencontrées au cours de certains traitements (apport excessif de bicarbonates) ou de régimes particuliers (buveurs de lait, régimes végétariens).

4.3.2. Compensation physiologique

La compensation va se faire par une augmentation de la pCO_2 par dépression des centres respiratoires (hypoventilation).

Il y aura diminution des échanges respiratoires et normalisation du pH.

Lorsque les bicarbonates deviennent supérieurs à 30 mmol/1, les urines deviennent alcalines. C'est la participation rénale à la compensation par diminution de la réabsorption des bicarbonates et de la production de NH_4^+.

4.3.3. Tableau clinique

Le patient présente une respiration lente et superficielle associée à une hyperexcitabilité neuromusculaire due à l'hypocalcémie ionisée. Rappelons qu'en cas d'alcalose le calcium ionisé se fixe en plus grande quantité sur les protéines.

4.3.4. Tableau biologique

Les dosages sanguins et urinaires montrent :
- un pH sanguin artériel augmenté mais rapidement et partiellement compensé ;
- une pCO_2 augmentée ;
- des bicarbonates augmentés à plus de 30 mmol/1 ;
- une pO_2 diminuée ;
- une hypokaliémie ;
- un pH urinaire qui peuj>être augmenté.

Après décompensation la situation de l'état acidobasique du sujet apparaît dans le quadrant supérieur droit B du diagramme de Davenport.

4.3.5. Traitement

II est avant tout étiologique. La réanimation visera à :
- éliminer facilement les bicarbonates sous perfusion,
- corriger l'hypokaliémie.

4.4. Alcalose respiratoire

Elle correspond à une **diminution de la pCO_2** (hypocapnie) dont l'origine estrespiratoire.

4.4.1. Étiologie

L'alcalose respiratoire est habituellement due à une **hyperventilation** et parfois à un abaissement de la pression partielle en O_2.

Les différentes causes sont :
- *une anxiété ou une douleur violente ;*
- *l'hyperventilation d'origine centrale :* **affections du système nerveux** central ;
- *l'hyperventilation d'origine hypoxique :* on sépare deux types d'hypocapnies hypoxiques par l'étude de la SaO_2 et de la pO_2.

Le plus fréquent est dit anoxémique et est la conséquence d'une respiration en atmosphère raréfiée ou d'une diminution des échanges respiratoires par lésions pulmonaires étendues. Dans les deux cas la pO_2 est très diminuée.

Le deuxième mécanisme est dit anémique et correspond à la perte du pouvoir

oxyphorique de l'hémoglobine (possibilité de transporter l'oxygène). La pO_2 est augmentée et ceci est secondaire à une anémie ou à une intoxication par l'oxyde de carbone (CO) ;

- *l'hyperventilation mécanique :* ventilation artificielle mal contrôlée.

4.4.2. Compensation physiologique

Le pH est augmenté car la pCO_2 est diminuée avec des bicarbonates normaux.

Le rein intervient en diminuant la réabsorption des bicarbonates.

Le pH redevient normal avec des bicarbonates diminués et une pCO_2 diminuée. Les échanges entre Na^+ et H"1" sont ralentis et les urines deviennent alcalines. Les bicarbonates plasmatiques sont remplacés par des chlorures.

Ces modifications ne sont mises en place que lors des troubles chroniques.

4.4.3. Tableau clinique

II y a une **hyperventilation** souvent évidente dans les états d'anxiété (spasmophilie) mais qui peut être inapparente si la respiration est profonde. L'irritabilité, les paresthésies et parfois des crises de tétanie ou des convulsions sont entretenues par l'alcalose et l'hyperpnée volontaire.

Le « mal des montagnes » se caractérise, lors de séjours en haute altitude, par des céphalées, une insomnie, des nausées et des vomissements, et éventuellement un œdème aigu pulmonaire.

4.3.4. Tableau biologique

II associe les éléments suivants :

- un pH artériel augmenté,
- une pCO_2 diminuée,
- une diminution des bicarbonates associée à une augmentation des chlorures qui traduisent la compensation rénale ;
- l'urine devient alcaline avec une forte augmentation des bicarbonates et du Na^+.

Après décompensation la situation de l'état acidobasique du sujet apparaît dans le quadrant inférieur droit C du diagramme de Davenport.

4.5. Syndromes mixtes

II s'agit le plus souvent d'acidoses. Schématiquement, il en existe deux types suivant que l'agression initiale est métabolique ou respiratoire.

1er cas : elle survient chez une personne présentant une acidose métabolique partiellement compensée par une hypocapnie et chez qui survient un trouble ventilatoire : la pCO_2 s'élève et le pH chute.

Le tableau biologique montre un pH bas avec des bicarbonates bas et une pCO_2 élevée.

2[e] cas : chez un insuffisant respiratoire, hypercapnique, victime d'une insuffisance rénale l'empêchant de réabsorber correctement les bicarbonates.

Ce sont des sujets dont la situation sur le diagramme de Davenport se trouve dans le cadran E.

5. *Conclusion*

Le bilan acidobasique complet implique aujourd'hui **l'association des mesures de la *pCOy* de la pO_2 et du pH,** avec appréciation de la saturation en oxygène. L'ensemble forme dans le jargon médical la « **gazométrie ».**

En raison de la fréquence des perturbations de l'équilibre acidobasique en pathologie, le suivi biologique des malades est indispensable afin d'assurer rapidement une correction thérapeutique.

Les appareils modernes associent souvent à la mesure des gaz du sang d'autres électrodes de mesure pour le sodium, le potassium, le chlorure, le calcium ionisé et effectuent en plus un dosage de l'hémoglobine. Ils ont ainsi considérablement simplifié la tâche des techniciens de laboratoire et apportent au clinicien un maximum d'informations biologiques contribuant à une meilleure réanimation des patients.

Références bibliographiques

P. Metais et al. *Biochimie clinique.* Tomes 1 et 2, 2[e] édition, Simep, Paris, 1990.

M. Essig, G. Friediander. *Troubles de l'équilibre acidobasique. La revue du Praticien,* 1997,47,1607-1615.

B.A. Shapiro, R.A. Harrison, **R.D. Cane, R.** Templin. *Gaz du sang. Applications cliniques.* Ed. Frison-Roche, Paris, 1992.

3

Métabolisme phosphocalcique

Michel Lagente

Le rôle le plus évident du calcium et du phosphore est de constituer l'essentiel de la charge minérale du squelette. Ces deux éléments exercent au niveau cellulaire et membranaire des actions sans doute plus importantes encore, puisque l'organisme n'hésite pas à les puiser dans le squelette pour réguler leur taux sanguins.

- Le calcium sous forme ionisée (Ça''''*'') intervient dans l'excitabilité neuromusculaire, dans le bon fonctionnement de maints systèmes enzymatiques et transports membranaires, dans la coagulation du sang, dans l'action de certaines hormones comme second messager cellulaire.

- Le phosphore intervient dans l'activation de certaines molécules biologiques comme les ose-phosphates, dans la mise en réserve de l'énergie (ATP), dans certains processus de régulation enzymatique, dans la composition de susbstances organiques indispensables (phospholipides, acides nucléiques).

Les métabolismes de ces deux constituants sont étroitement liés pour de multiples raisons dont la principale est la grande insolubilité du phosphate tricalcique $[(PO_4^{3-})_2 (Ca^{++})_3]$ au pH des liquides de l'organisme.

Ce facteur est déterminant à tous les stades du métabolisme de ces deux constituants :

- il limite l'absorption intestinale du calcium et du phosphore par nécessité d'un rapport Ca^{++}/PO_4^{3-} favorisant leur solubilité intraluminale ;
- il influe sur la vitesse de formation et de résorption de l'os ;
- il influe sur la concentration de ces ions dans le plasma par le produit de solubilité, Ca^{++} x HPO_4^{2-} qui doit être constant ;
- **il est** responsable des calcifications pathologiques et de la formation des calculs de phosphate tricalcique dans les voies urinaires.

Sans doute en relation avec l'importance vitale de ces ions (surtout du calcium) il existe un contrôle hormonal étroit de leurs concentrations sanguines par l'intermédiaire de la parathormone (PTH), de la calcitonine (CT) et de la vitamine D.

1. Métabolisme du calcium et du phosphore

1.1. Calcium

C'est un élément (Ça) alcalinoterreux de poids atomique 40.

C'est l'électrolyte quantitativement le plus important de l'organisme humain puisqu'il représente un poids d'environ 1 kg (25 moles) chez un adulte de 70 kg.

1.1.1. Bilan des échanges calciques : le cycle du calcium

Chez un adulte en équilibre calcique le bilan des échanges calciques peut être représenté comme suit (figure 3.1) :

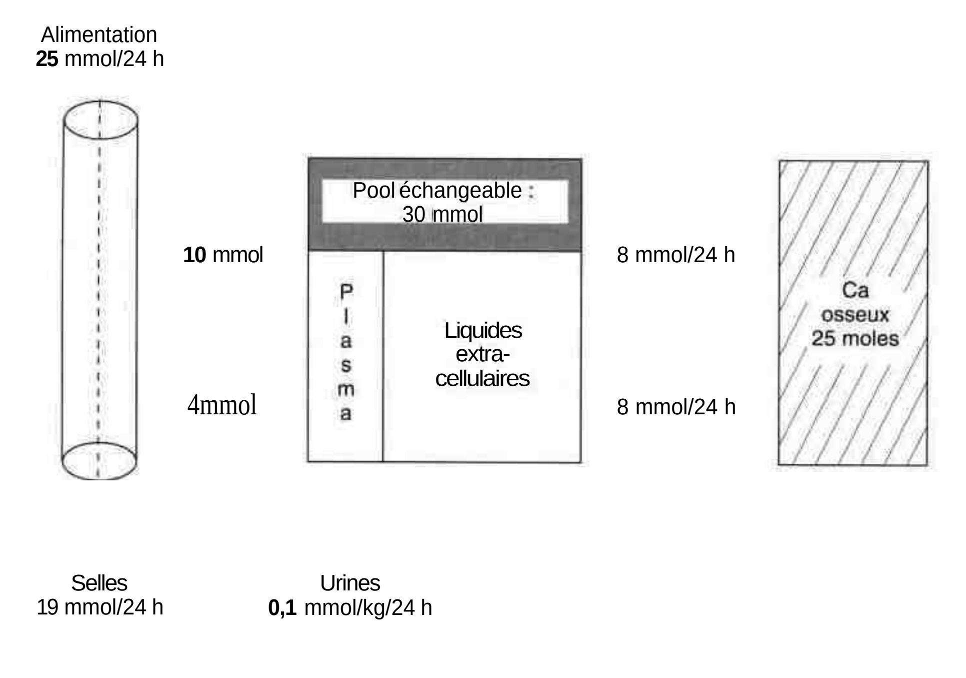


Figure 3.1 • Cycle du calcium.

Le calcium absorbé par voie intestinale est distribué dans l'organisme par les liquides extracellulaires, dont le sang, qui font partie du pool échangeable.

Sa destinée essentielle est le tissu osseux où il est déposé (accrétion) mais aussi repris (résorption) de manière équilibrée. La partie non absorbée, augmentée de la partie sécrétée, est éliminée dans les selles. L'élimination urinaire représente normalement la partie nette absorbée.

C'est à chaque niveau d'échange, tube digestif, os, rein que les actions hormonales permettront la régulation de la calcémie.

1.1.2. Besoins calciques et apports alimentaires

Les besoins d'un adulte sont d'environ **10 mmol (400 mg) de calcium par jour.**

Les enfants et les adolescents demandent 30 mmol/j (1,2 g) pour constituer leur squelette.

Les besoins en calcium sont encore plus élevés chez les femmes enceintes, ou chez celles qui allaitent, et aussi chez les femmes ménopausées (100 mmol/j soit 4g).

Ces besoins sont largement couverts en Europe. Le calcium est apporté essentiellement sous forme de lait et de fromages. Certaines eaux de boisson sont relativement riches en calcium (Contrexéville en contient 467 mg/1).

1.1.3. L'absorption intestinale

L'absorption intestinale du calcium a lieu essentiellement au niveau du duodénum en milieu acide. On admet que celle-ci s'effectue par l'intermédiaire d'un *mécanisme actif,* hormone-dépendant, et d'un *mécanisme passif* ne dépendant que des concentrations relatives de calcium entre la lumière intestinale et celle du plasma.

Le mécanisme actif fait intervenir **la cellule intestinale** dans laquelle le calcium rentre par la bordure en brosse, traverse le cytosol, et est rejeté dans la circulation sanguine par l'intermédiaire d'une ATP-ase Ça et magnésium (Mg) dépendante. Un système échangeur Na/Ca intervient aussi dans ce rejet. Une protéine dite CaBP (calcium binding protein) interviendrait dans ce transport, mais son rôle précis est encore à définir ;

La 1,25-dihydroxy vitamine D_3 (1-25 diOH D_3) est le régulateur de cette voie cellulaire. Elle augmente l'entrée du calcium dans la cellule, active l'ATP-ase Ça et Mg dépendante et permet la synthèse de la CaBP.

Le mécanisme passif est paracellulaire et ne dépend que du gradient de concentration entre le taux du calcium de la lumière intestinale et celui du plasma. Ce mouvement passif peut être une absorption (concentration de calcium supérieure dans la lumière intestinale) ou une sécrétion (concentration supérieure dans le plasma).

Notre alimentation apporte quotidiennement au moins 10 mmol de calcium (400 mg) ce qui suffit à avoir un bilan nul.

Au-dessus de cette valeur, l'absorption nette (quantité absorbée moins quan-

tité sécrétée) devient positive mais n'augmente que faiblement avec l'augmentation des apports, par la mise en jeu d'une régulation faisant intervenir une diminution de sécrétion de la PTH ; si l'apport en calcium augmente dans les ingestats, l'absorption passive augmente entraînant une augmentation du calcium plasmatique responsable d'une diminution de sécrétion de la parathormone. Celle-ci sera responsable d'une diminution de production de la 1,25-dihydroxy-vitamine D_3 diminuant le calcium absorbé par voie active (voir le métabolisme de la vitamine D).

Outre un taux optimal de phosphates évitant la précipitation du phosphate tricalcique d'autres facteurs vont intervenir sur l'absorption du calcium. L'acidité, une teneur élevée en sodium et en lactose, la présence de citrates augmentent l'absorption du calcium. Au contraire la présence de phytates, d'oxalates, de graisses, de fibres donnant des sels insolubles diminue l'absorption du calcium.

1.1.4. Répartition dans l'organisme

***1.1.4.1.** Répartition quantitative*

99 % du calcium se trouvent dans les os où il est déposé sur la trame protéique sous forme de cristaux d'hydroxyapatite.

1 % se retrouve dans les tissus mous (muscles, tendons, peau, viscères) et les liquides extracellulaires dont le sang.

1.1.4.2. Formes du calcium sanguin

Dans le sang le calcium est essentiellement plasmatique, les globules rouges en contenant très peu. La valeur habituelle normale de la calcémie (taux de calcium plasmatique) chez un adulte est comprise entre **2,75** ***et*** *2,55* ***mmol/1*** avec une valeur moyenne de 2,3 à 2,4 mmol/1.

Le calcium plasmatique se trouve sous deux formes (figure 3.2) :

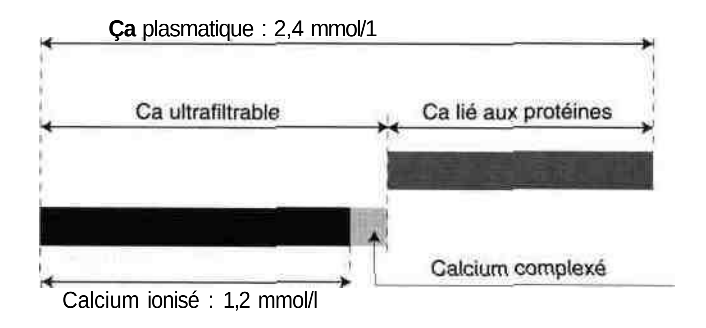


***Figure** 3.2* • Répartition du calcium plasmatique

- une partie non ultrafiltrable, à peu près 40 % soit 1 mmol/1, est *liée aux protéines* en majorité à l'albumine et un peu aux globulines. Une variation des protéines totales donnera une variation de la calcémie dans le même sens ; toute augmentation du taux des protéines sanguines donnera une augmentation de la calcémie et toute diminution de ces protéines donnera une diminution de la calcémie. Ce phénomène doit être toujours présent à l'esprit lors de l'interprétation d'un résultat de calcémie ;

- une partie ultrafiltrable, se trouve sous forme de calcium ionisé (à peu près 50 %) et sous forme de calcium complexé, (à peu près 10 %).

E *Le calcium ionisé* (Ça"*"*") est l'élément régulé hormonalement dans des limites très étroites, *1,17 à 1,30 mmol/l.* C'est le calcium important du point de vue physiologique ; c'est lui qui intervient dans la coagulation du sang, dans certaines perméabilités cellulaires, dans beaucoup de systèmes enzymatiques, dans la rythnùcité cardiaque et dans l'excitabilité neuromusculaire. Dans celle-ci, le calcium ionisé intervient par l'intermédiaire du rapport suivant :

$$\frac{(Na^+) + (K^+)}{(Ca^{++}) + (Mg^{++}) + (H^+)}$$

i

Une diminution du calcium ionisé (ou du magnésium) entraînera une augmentation de l'excitabilité neuromusculaire et pourra être responsable d'une crise de tétanie.

Le calcium lié à l'albumine est très sensible à l'équilibre acidobasique. Une acidose entraîne une diminution de cette liaison et augmente le calcium ionisé ; à l'inverse, une alcalose augmente cette liaison et diminue le taux de calcium ionisé. Cette propriété peut être mise à profit pour faire céder une crise de tétanie en provoquant une acidose respiratoire.

Le calcium complexé l'est sous forme de sels solubles mais peu dissociés : phosphates, bicarbonates, citrates et sulfates.

1.1.5. Élimination

1.1.5.1. Elimination fécale

Elle est constituée du calcium alimentaire qui n'a pas été absorbé, augmenté du calcium contenu dans les différents sucs digestifs.

1.1.5.2. Élimination urinaire

Seul le calcium ultrafiltrable filtre à travers le glomérule rénal et plus de 95 % sont réabsorbés dans les tubes rénaux. La réabsorption maximale a lieu dans le tube proximal où le calcium est réabsorbé avec le sodium et l'eau. L'anse de Henlé et le tube distal réabsorbent la quasi totalité du calcium résiduel n'en laissant que moins de 10 mmol/24 h (0,1 mmol/kg/24 h) dans l'urine. Dans un état

d'équilibre chez un adulte jeune, la calciurie représente la quantité intestinale nette de calcium absorbée.

En fait la calciurie dépend pour beaucoup de la calcémie. Pour une calcémie basse la totalité du calcium est réabsorbée. Pour une calcémie normale, une très petite partie du calcium filtré est éliminée. En cas d'hypercalcémie la moitié du calcium est réabsorbée et l'autre moitié est éliminée. Ceci revient à dire qu'il n'existe pas de seuil maximum de reabsorption pour les calcémies les plus fréquemment rencontrées.

Un certain nombre de facteurs peuvent influer sur cette réabsorption :
- en l'augmentant ; la PTH et l'alcalose métabolique ;
- en la diminuant ; la calcitonine et l'acidose métabolique.

1.2. Phosphore

C'est un élément métalloïde de poids atomique 31. Un adulte de 70 kg en possède environ 600 g (soit près de 20 moles) essentiellement sous forme de phosphates.

1.2.1. Besoins en phosphates et apports alimentaires

Chez un adulte ils sont **de l'ordre de 31 mmol/24 h** (1 g), davantage chez un enfant pendant sa croissance. En Europe l'alimentation couvre largement ces besoins en apportant des aliments riches en phosphates tels que le lait et les laitages, la viande (acides nucléiques), les œufs (lécithines) et les céréales.

7.2.2. *Absorption*

L'absorption des phosphates se fait essentiellement **au niveau du jéjunum et de l'iléon** où l'absorption nette est de l'ordre de 65 % des phosphates ingérés. Comme pour le calcium il existe une absorption passive para-cellulaire qui ne dépend que du gradient de concentration en phosphates entre la lumière intestinale et le plasma, et une absorption active, cellulaire, dépendant de la 1,25-dihydroxy-vitamine D_3.

Cependant si les apports alimentaires augmentent, la fraction absorbée augmente dans les mêmes proportions, l'absorption n'étant pas régulée comme pour le calcium. La quantité de phosphates absorbés quotidiennement **est donc très variable en fonction de l'alimentation.**

1.2.3. Répartition dans l'organisme

1.2.3.1. Répartition quantitative

- 85 % des phosphates sont liés au calcium au niveau de l'os sous forme de cristaux d'hydroxyapatite.
- 14 % se localisent au niveau des cellules des tissus mous.
- 1 % se retrouve dans les liquides extracellulaires dont le sang.

1.2.3.2. Phosphates plasmatiques

Le plasma contient plus de 4 mmol/1 de phosphates sous forme de :

- Phosphates organiques ; ATP, phospholipides.
- Phosphates inorganiques (Pi) ; c'est ce qui est dosé sous le nom de phosphorémie ou *phosphatémie ;* 90 % des Pi sont ultrafiltrables et 10 % sont liés à des protéines. La valeur physiologique de la phosphatémie est de *0,8* ***à 1,3 mmol/l*** cependant avec des variations parfois plus importantes en fonction des apports alimentaires et du métabolisme énergétique. Au pH du sang 15 % des Pi sont sous forme monométallique ($H_2PO_4^-$) et 85 % sous forme bimétallique (HPO_4^{2-}) ce qui leur permet d'intervenir dans l'équilibre acido-basique.

1.2.4. Elimination

1.2.4.1. Élimination fécale

Comme pour le calcium les selles contiennent les phosphates non absorbés et ceux contenus dans les sucs digestifs. L'élimination des phosphates est surtout rénale.

1.2.4.2. Élimination rénale

Le phosphore inorganique ultrafiltrable est filtre au niveau du rein mais 90 % sont réabsorbés dans le tubule proximal. Cette réabsorption ne dépasse pas un taux maximum de réabsorption (TmPi) au-delà duquel l'élimination urinaire est proportionnelle à la phosphorémie.

L'élimination urinaire est donc largement dépendante de l'alimentation, **et** comme pour le calcium, on peut dire que chez un adulte jeune normal, la quantité de phosphates excrétée dans les urines, de 10 à 25 mmol/24 h, correspond à l'aborption nette intestinale.

Cette reabsorption est influencée par les besoins cellulaires en phosphates, sans que l'on sache précisément le mécanisme, mais la réabsorption augmente quand les besoins cellulaires augmentent et réciproquement.

Cette réabsorption est soumise, de plus, à une régulation hormonale et humorale :

- la PTH entraîne une diminution de la réabsorption des Pi, ainsi que les corticostéroïdes, la calcitonine à fortes doses et l'acidose métabolique ;
- l'hormone de croissance va augmenter au contraire, la reabsorption des Pi.

2. *Régulation du métabolisme phosphocalcique*

L'importance physiologique du calcium plasmatique et plus précisément sa fraction ionisée fait que ce paramètre doit être maintenu dans des limites très

étroites, et de fait c'est l'un des éléments les plus stables de notre plasma sanguin.

Les Pi sont moins bien régulés.

La régulation fait intervenir trois sites : **le tube digestif, l'os, et le rein** au niveau desquels peuvent intervenir trois hormones : **la PTH, la calcitonine, et la vitamine D.**

2.1. Sites de régulation

2.1.1. Tube digestif

Tous les éléments ont été donnés dans la partie métabolique.

Rappelons que l'absorption du calcium et celle du phosphore sont influencées par la 1,25-dihydroxy vitamine D_3, celle-ci étant nécessaire au transfert actif de ces éléments à travers la cellule intestinale. La parathormone et la calcitonine n'ont pas d'action directe sur le tube digestif. L'absorption du calcium est régulée en fonction des apports, alors que celle des phosphates ne l'est pas.

2.7.2. Os

On a cru pendant longtemps que l'os était un tissu inerte jouant un rôle de simple armature. Nous savons maintenant qu'il est en perpétuel remaniement et qu'un phénomène de construction osseuse appelé *accréîion* doit compenser exactement un phénomène de destruction appelé *résorption.* Par ce biais il peut être considéré comme un véritable organe métabolique participant activement à l'homéostasie calcique.

2.1.2.1. Rappel structural

Le tissu osseux est un tissu conjonctif calcifié formé d'une matrice protéique, appelée tissu ostéoïde, dans laquelle sont inclus des cristaux de phosphate de calcium, surtout sous forme *d'hydroxyapatiîe.*

- Le tissu ostéoïde est essentiellement constitué d'une protéine fibreuse, le collagène de type I, disposée en réseau au sein de la substance fondamentale. A côté du collagène d'autres protéines ont été découvertes ; il s'agit de l'ostéocalcine *(bone Glaprotein* ou BGP des Anglo-Saxons) et de l'ostéonectine.

- La fraction minérale de l'os est constituée par de petits cristaux hexagonaux disposés longitudinalement sur les fibres de collagène. Le calcium s'y trouve pour une grande part sous forme d'hydroxyapatite $(Ca_3(PO_4)_2)_3$, $Ca(OH)_2$ et un peu sous forme de carbonate apatite $(Ca_3(PO_4)_2)_3$, CaC03.

Chaque cristal osseux est formé de trois couches : un noyau où le calcium est fixé et très difficilement mobilisable, une couche moyenne hydratée où le calcium est labile et mobilisable, une couche périphérique aqueuse à travers laquelle se font les échanges avec le milieu extracellulaire.

Ce tissu n'est pas figé mais en perpétuel remodelage sous l'action des cellules osseuses.

2.1.2.2. Remodelage osseux

II est le fait de trois types de cellules : les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes.

- Les ostéoblastes sont des cellules de grande taille, mononucléées, issues de cellules mésenchymateuses. Ils sont responsables de l'édification du tissu osseux en formant une couche monocellulaire au contact du tissu ostéoïde qu'ils viennent de construire. Ils synthétisent le collagène, l'ostéocalcine, l'ostéonectine, et les glycosaminoglycannes, ces derniers rentrant dans la structure de la substance fondamentale.

Ces ostéoblastes participent ensuite à la minéralisation du tissu ostéoïde en sécrétant certaines enzymes, les phosphatases alcalines, qui permettront la précipitation puis la nucléation du phosphate tricalcique qui donnera l'hydroxyapatite. La progression de la calcification va englober les ostéoblastes au sein du tissu osseux. Ils vont alors devenir des ostéocytes.

Toute augmentation de la synthèse du tissu ostéoïde pourra se traduire par une augmentation de l'activité sanguine des phosphatases alcalines accompagnée de l'augmentation du taux sanguin de l'ostéocalcine.

- Les ostéocytes sont des cellules emprisonnées entre les lamelles osseuses. Elles émettent de fines ramifications le long des lamelles et d'une lamelle à l'autre à l'intérieur de canalicules. Elles seraient capables d'accrétion et de résorbption strictement localisées et de ce fait elles semblent intervenir activement dans la régulation de la calcémie.

- Les ostéoclastes sont des cellules géantes plurinucléées naissant de la fusion des macrophages. Elles creusent l'os compact, créant des cavités de résorption en solubilisant les cristaux d'hydroxyapatite et en hydrolysant le collagène. Ces cellules sont très mobiles et s'appliquent contre l'os pendant la phase de résorption.

Frost a montré que les deux phénomènes de résorption et d'accrétion étaient intimement liés dans le temps et dans l'espace.

A un instant donné, dans un endroit donné, un processus d'activation (A) inconnu (origine endocrinienne ou mécanique ?) conduit à l'apparition d'un foyer **de résorption** (R) occupé par des ostéoclastes. La cavité ainsi creusée sera secondairement comblée par du tissu ostéoïde élaboré par des ostéoblastes au cours d'une **phase de formation** (F) et cette matrice sera enfin minéralisée. La séquence est toujours la même A -> R —> F. Il y a toujours une zone antérieure de résorption et une zone postérieure de formation et la durée de la résorption est toujours beaucoup plus courte que celle de l'accrétion. L'ensemble du foyer forme un *basic multicellular unit (BMU).* L'activité des BMU dont les évolutions sont décalées dans le temps (figure 3.3) ne concerne simultanément que 20 % au plus des faces osseuses. La durée de vie d'un BMU est

chez l'homme normal estimée à trois ou quatre mois pour l'os cortical haversien.

Chez l'adulte, résorption et reconstruction doivent s'équilibrer à l'état normal. Un déséquilibre peut exister :

- soit par manque de minéralisation qui se traduit par un excès de tissu ostéoïde, c'est *l'ostéomalacie* de l'adulte, équivalent du rachitisme chez l'enfant ;
- soit par un excès de résorption portant sur la fraction protéique et sur la fraction minérale, c'est *l'ostéoporose.*

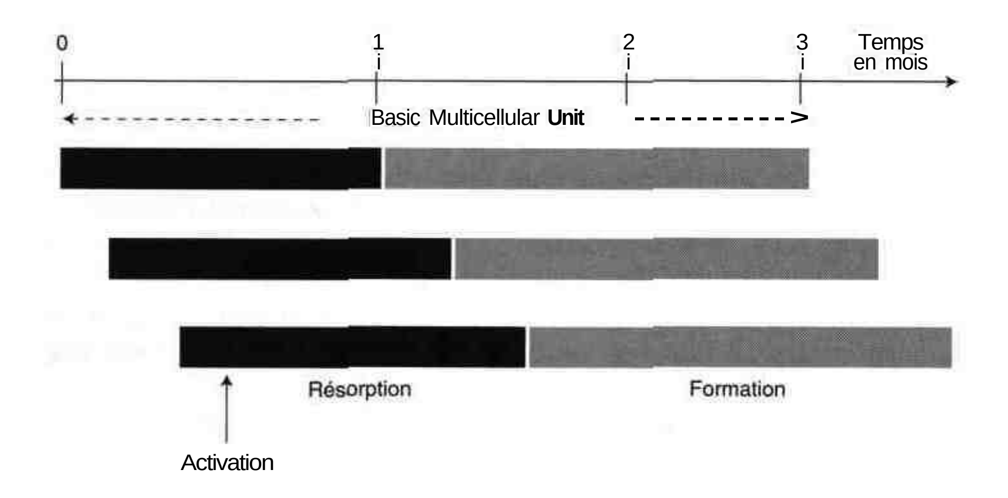


Figure 3.3 • Dynamique du remodelage osseux.

Ce renouvellement osseux permanent est à l'origine d'un certain nombre de dosages sanguins et urinaires permettant d'apprécier l'équilibre qui doit exister entre la destruction et la reconstruction de l'os. Ces « marqueurs du remodelage osseux » sont d'une grande utilité en particulier pour le dépistage d'une destruction trop importante (ostéoporose).

- Les marqueurs du remodelage osseux s'appréhendent mieux s'ils sont replacés dans le contexte de la synthèse du collagène 1 (figure 3.4).

Au niveau osseux les ostéoblastes synthétisent des chaînes polypeptidiques qui vont s'assembler par 3 (2 chaînes al et une chaîne a2 pour le collagène I) au sein d'une triple hélice constituant le procollagène. Ces polypeptides sont riches en certains acides aminés comme l'hydroxyproline et la lysine (LYS). Des peptides appelés « peptides d'extension » sont ensuite coupés aux 2 extrémités : *PICP* du côté C-terminal (propeptide C-terminal du procollagène I) libéré dans la circulation sanguine et peptides N-terminaux vraisemblablement réincorporés dans l'os. On obtient ainsi le tropocollagène qui possède aux extrémités non hélicoïdales des *télopeptides* C et N-terminaux. Le PICP pourra servir de marqueur de formation osseuse.

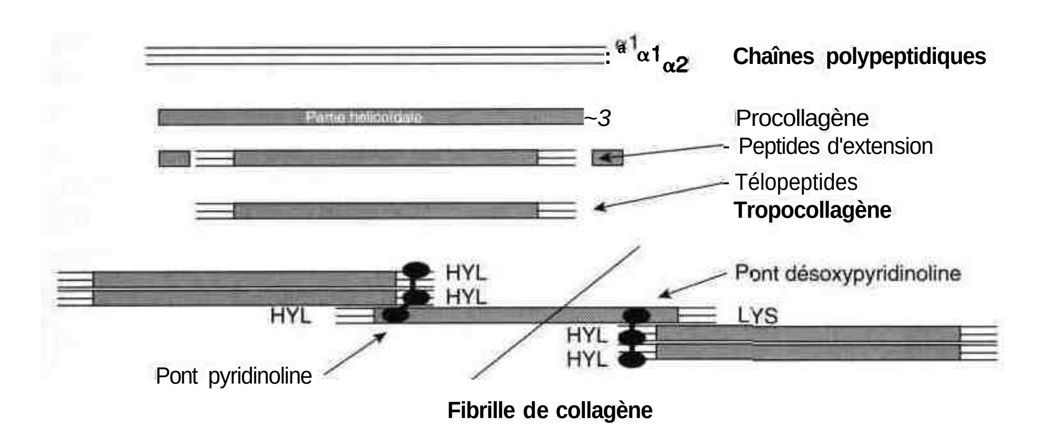


Figure 3.4 • Biosynthèse du collagène.

Au sein de l'hélice certaines lysines seront oxydées en hydroxylysines (HYL) et celles ci pourront participer à la création de « ponts ». En effet plusieurs molécules de tropocollagène s'assembleront ensuite pour constituer la fibrille de collagène et seront réunies par des ponts « pyridinolines » *(crossiinks).* Deux types de ponts sont retrouvés :

- le pont pyridinoline (Pyr) unissant 2 résidus hydroxylysyl (un sur al un sur a2) des télopeptides de 2 tropocollagènes différents à une hydroxylysine de la partie hélicoïdale d'un troisième procollagène (Pyr = HYL(al)-HYL (a2)-HYL) ;
- le pont désoxypyridinoline (D-Pyr) qui voit le remplacement de l'hydroxylysine de la partie hélicoïdale par une lysine (D-Pyr = HYL(al)-HYL (a2)-LYS).

La formation osseuse sera donc appréciée par les dosages sanguins des phosphatases alcalines, de l'ostéocalcine et du propeptide C-terminal du procollagène I.

Au contraire lors de la destruction du collagène on pourra doser un certain nombre de molécules dans les urines comme *Yhydroxyproline,* les *télopeptides C ou N-terminaux* et *les pyridinolines* associant pyridoline et désoxypyridinoline. Ces pyridinolines sont retrouvées soit sous la forme du pont seul (40 %) soit sous la forme du pont associé à des petits peptides (60 %).

2.1.2.3. Système ostéocytes/cellules de revêtement

Toutes les surfaces *au repos* (donc en dehors d'un BMU) sont recouvertes d'une membrane fenestrée formée de cellules de revêtement, possédant des propriétés ostéocytiques, et communiquant avec les ostéocytes plus profonds par leurs ramifications (figure 3.5).

Selon une-théorie récente ces cellules joueraient un rôle très important dans l'homéostasie calcique. Un transport *passif* du calcium ionisé s'effectue du

liquide extracellulaire extra-osseux en équilibre avec le sang (1,20 mmol/1) vers le liquide extracellulaire intra-osseux (0,4 mmol/1) qui est en équilibre avec les ostéocytes et l'os environnant.

Dans le but d'équilibrer cet influx de Ca^{++}, un mécanisme actif sensible à la PTH et à la calcitonine est localisé dans les cellules de revêtement et rejette le Ca^{++} vers **le** liquide extracellulaire extra-osseux et donc le sang. La possibilité de pompage d'un tel système peut aller jusqu'à 240 mmol/24 h et contribue donc très fortement à la régulation du calcium ionisé plasmatique.

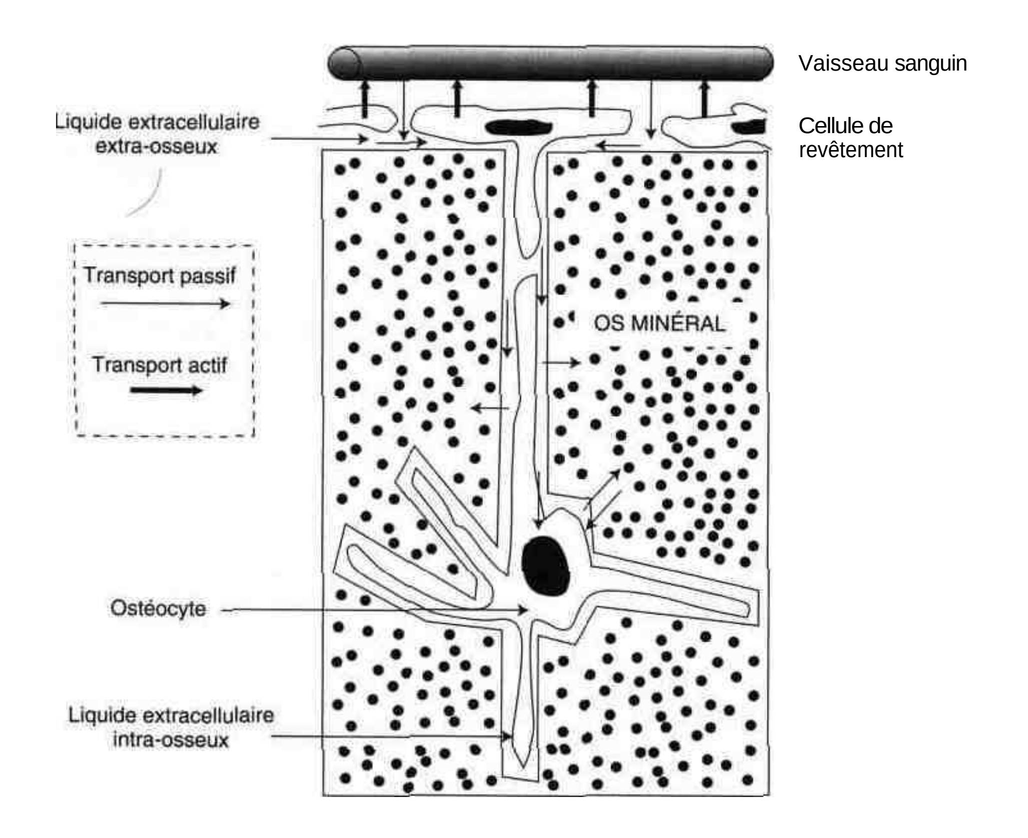


Figure 3.5 • Système ostéocytes/cellules de revêtement

La PTH augmente le rejet par les cellules de revêtement alors que la calcitonine le diminue.

2.1.3. Rein

Le rein par sa possibilité de filtration et de réabsorption du calcium et du phosphore va jouer un grand rôle dans l'homéostasie phosphocalcique. Les élé-

ments de la fonction rénale ont été donnés précédemment. Rappelons qu'il existe un taux de réabsorption maximal pour le phosphore alors qu'il n'en existe pas pour le calcium.

2.2. Hormones régulatrices

Elles sont au nombre de trois : la parathonnone, la calcitonine, et les dérivés de la vitamine D qui peuvent être considérés comme de véritables produits hormonaux.

2.2.1. Parathonnone

2.2.1.1. Métabolisme

La parathortnone est synthétisée par les cellules principales des parathyroïdes sous forme d'un précurseur (pré-pro PTH) de 115 acides aminés (AA). Celui-ci est ensuite clivé pour donner la pro-PTH de 90 AA qui est stockée dans les granules cytoplasmiques. Après protéolyse elle est finalement sécrétée dans la circulation sous forme d'hormone active composée de 84 AA.

Cette PTH 1-84 est clivée dans le foie et dans les reins pour donner un fragment *N-terminal à 34 AA qui est porteur de toute l'activité biologique,* et dont la demi-vie est très courte, (moins de 5 minutes). Ce fragment **stimule la production intracellulaire d'AMP cyclique** (AMPc) par l'intermédiaire duquel il manifeste son action au niveau des organes cibles. C'est ainsi qu'il fait sécréter de l'AMPc par les cellules du tube proximal qui vont ensuite l'excréter dans les urines : c'est l'AMPc néphrogénique qui est considéré pour cette raison comme un bon reflet de la sécrétion de la PTH. Ce fragment 1-34 est dégradé dans les tissus cibles.

La partie C-terminale peut être représentée par un ou plusieurs fragments qui sont tous dépourvus d'activité biologique. Leur clairance métabolique est assurée par filtration glomérulaire puis catabolisme dans les cellules du tubule rénal.

Auparavant la plupart des dosages de la PTH utilisaient des antisérums dirigés contre les fragments C-terminaux ce qui expliquait les variations importantes observées en fonction de l'état rénal. Il est possible maintenant de doser la PTH 1-84 ce qui permet de connaître la sécrétion réelle parathyroïdienne.

2.2.1.2. Fonctions biologiques

Elles ont été précisées au fur et à mesure du métabolisme. Elles sont résumées dans la figure 3.6.

Le stimulus de la sécrétion de PTH est le taux plasmatique de Cû''1''''1'. Une diminution du Ça'1'4'' entraîne une augmentation de sécrétion de la parathonnone et au contraire une augmentation du Ça''1''1' est responsable d'une diminution de sécrétion de la PTH. Le taux des phosphates n'a aucune action sur la sécrétion de la PTH.

Au niveau de l'os **la PTH augmente le nombre de sites de remodelage ce** qui explique que pour des concentrations physiologiques cette résorption soit suivie d'une accrétion osseuse secondaire. Cependant pour des concentrations très élevées la résorption l'emporte sur l'accrétion et l'action de la PTH aboutit à une destruction progressive de l'os.

Au niveau du rein, outre les actions sur le métabolisme du calcium et du phosphore la PTH stimule **la production rénale du métabolite le plus actif de la vitamine D, le la, 25-diOH D_3.**

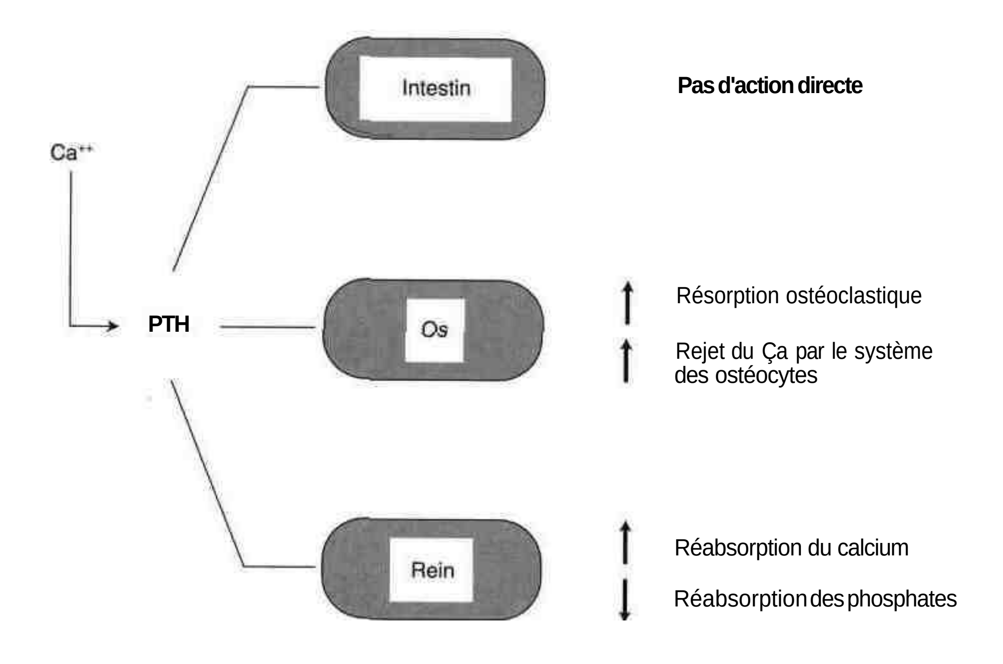


Figure 3.6 • Fonctions biologiques de la parathormone.

Au total la PTH est une hormone hypercalcémiante et hypophosphoré-miante.

2.2.2. *Calcitonine*

2.2.2.1. Métabolisme

La calcitonine (CT) est synthétisée et sécrétée par les cellules parafolliculaires de la thyroïde. La sécrétion est surtout régulée par le calcium extracellulaire mais la prise alimentaire et certaines hormones comme la gastrine et le glucagon jouent un rôle. Une augmentation du calcium extracellulaire entraîne une augmentation de la sécrétion de CT, alors qu'une diminution de calcium extracellulaire inhibe cette sécrétion.

La calcitonine est sécrétée sous forme d'une pro-hormone qui sera coupée pour donner un peptide circulant de 32 AA.

2.2.2.2. *Fonctions biologiques*

La CT a des fonctions complexes qui ne sont pas encore bien connues. Le rôle principal de cette hormone est de stimuler les capacités corporelles à s'adapter à une surcharge calcique. Certaines fonctions de cette hormone sont regroupées dans lajigure 3.7.

Au niveau du rein une injection unique de calcitonine augmente l'excrétion de calcium par diminution de sa réabsorption. Une injection continue va augmenter la calciurie dans un premier temps, mais la diminuer ensuite du fait de la diminution de la résorption osseuse.

Elle a de plus, une action freinatrice sur la transformation rénale du métabolite 25-OH de la vitamine D.

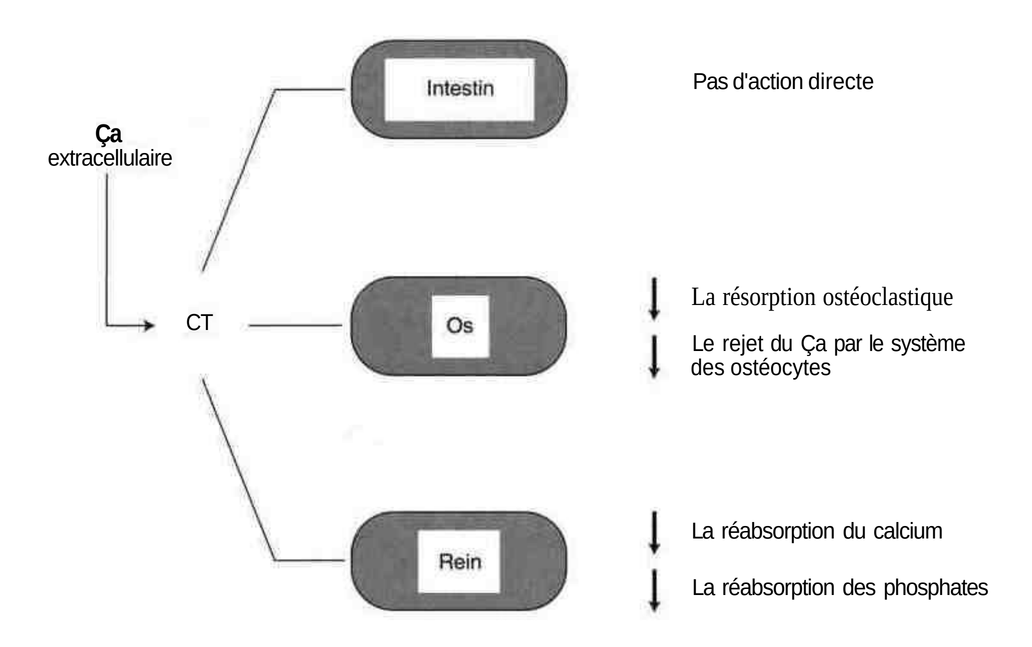


Figure 3.7 • Fonctions biologiques de la calcitonine.

Au total, c'est une hormone hypocalcémiante.

2.2.3. *Vitamine D*

Ce sont les métabolites de la vitamine D_3 (D_3) qui ont une action dans le métabolisme phosphocalcique. On continue à les dénommer vitamines bien que

l'organisme humain soit capable de les synthétiser et de ce fait il faut les considérer comme de véritables hormones.

2.2.3.1. Métabolisme

Le métabolite le plus actif est le la, 25-dihydroxyvitamine ***Dy*** dont la synthèse est représentée dans la figure 3.8.

L'hormone active est synthétisée à partir de la vitamine D_3, ou cholécalciférol. Le cholécalciférol est soit d'origine alimentaire (vitamine D_3 naturelle) soit synthétisé à partir du 7-déhydrocholestérol de la peau sous l'action des rayons ultraviolets. Le 7-déhydrocholestérol est un précurseur direct dans la synthèse du cholestérol, mais se retrouve aussi dans le jaune d'œuf, les poissons et le lait.

Après une première hydroxylation hépatique sur le carbone 25 du cholécalciférol, la synthèse se poursuit par une hydroxylation rénale en position a sur le carbone 1 et aboutit au la, 25-dihydroxyvitamine *Dy* ou calcitriol.

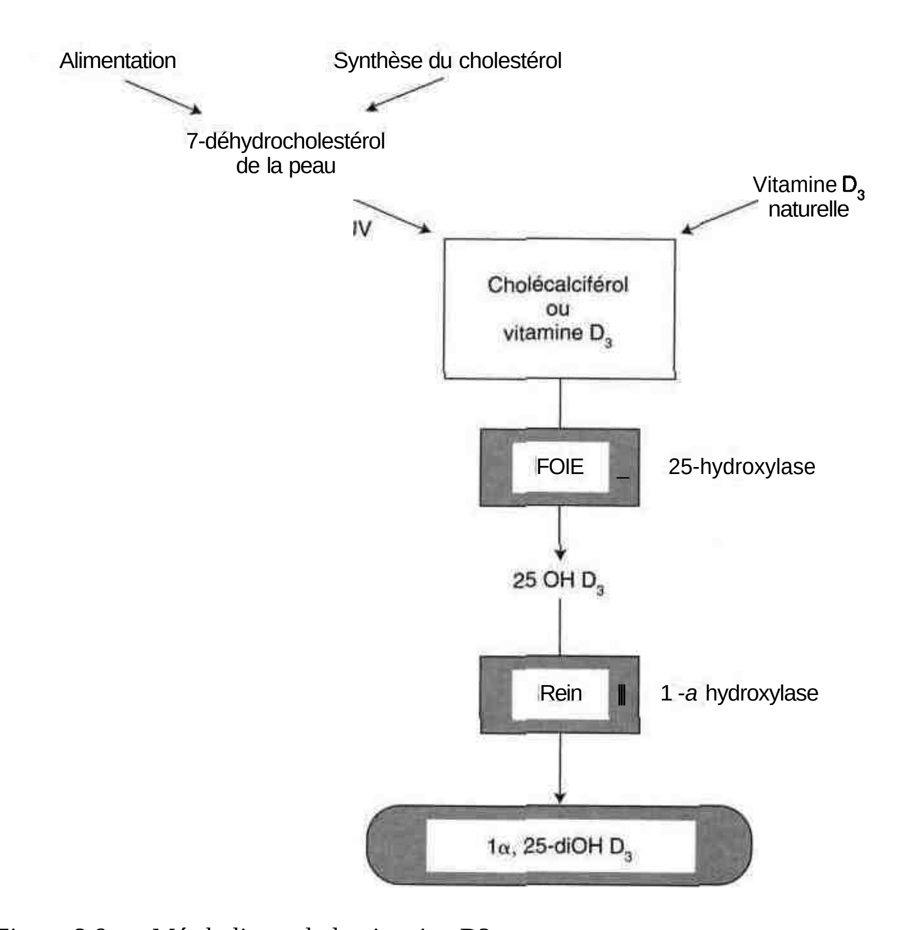


Figure 3.8 • Métabolisme de la vitamine D3.

Cette dernière hydroxylation est le fait d'une enzyme rénale, *la 1a hydroxylase.*

Il existe d'autres-hydroxylases rénales et en particulier la 24 hydroxylase qui synthétise le 24, **25-diOH *Dy*** métabolite dont on ne connaît pas encore précisément le rôle.

L'activité biologique maximale est le fait du calcitriol mais comme l'organisme fabrique cent fois plus de 25-OH D_3 ce métabolite peut avoir quelques effets biologiques directs.

La synthèse du la, 25-diOH D_3 est régulée par l'activité de la la hydroxylase comme le montre la figure 3.9.

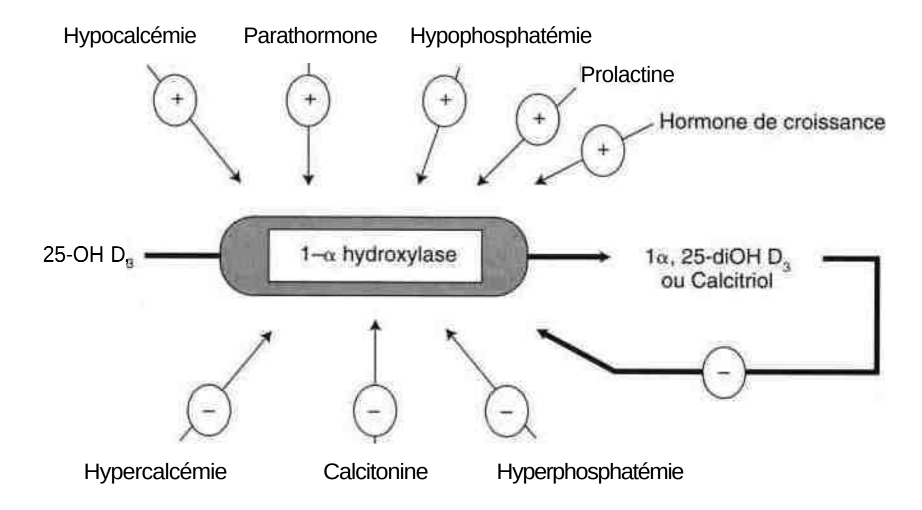


Figure 3.9 • Régulation **de la synthèse du** calcitriol.

Celle-ci est activée par la parathormone, l'hypocalcémie et l'hypophosphatémie. L'hormone de croissance et la prolactine stimulent aussi cette enzyme comme cela est observé chez l'enfant pendant la croissance et chez la femme qui allaite.

Au contraire l'hypercalcémie, l'hyperphosphorémie importante et la calcitonine inhibent l'action de l'enzyme.

Enfin le taux circulant de calcitriol régule l'activité de l'enzyme par un mécanisme de feed-back.

La réduction de la masse néphronique observée au cours du vieillissement ou de l'insuffisance rénale entraîne toujours une diminution de production du calcitriol.

La demi-vie de cette hormone est de 12 heures.

2.2.3.2. *Fonctions biologiques*

L'effet principal du calcitriol est de fournir des quantités suffisantes de calcium et de phosphore au niveau de l'os pour permettre la minéralisation de ce dernier.

Elle agit surtout sur l'intestin et sur l'os (figure 3.10).

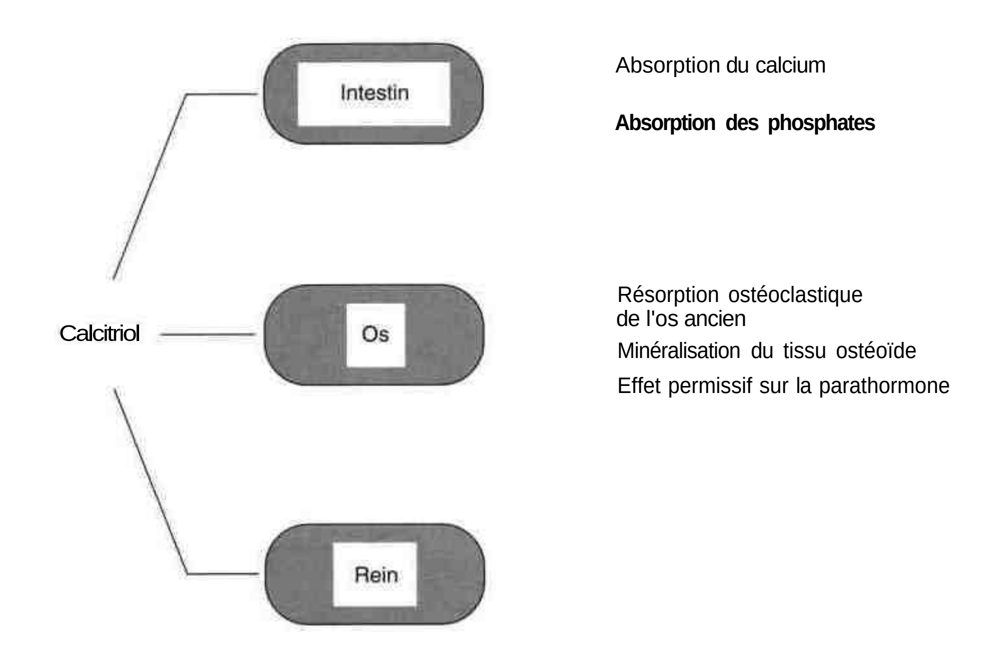


Figure 3.10 • Fonctions biologiques du calcitriol.

Au niveau de l'intestin elle favorise l'absorption du calcium et du phosphore.

Au niveau de l'os la carence en vitamine D entraîne un défaut de minéralisation du tissu ostéoïde responsable du rachitisme chez l'enfant et de l'ostéomalacie chez l'adulte. Son action sur les ostéoblastes est responsable de la synthèse du collagène et de l'ostéocalcine avec stimulation de l'activité des phosphatases alcalines favorisant la minéralisation.

De plus sa présence est indispensable pour que la parathormone puisse exercer son action ostéolytique.

Le calcitriol est aussi capable d'activer les ostéoclastes de l'os ancien pour fournir le calcium et le phosphore nécessaires à la minéralisation du tissu ostéoïde de l'os nouveau.

2.2.4. Autres hormones

2.2.4.1. Hormones sexuelles

Elles augmentent l'absorption intestinale du calcium et favorisent la synthèse de la trame protéique de l'os ainsi que sa minéralisation. L'ostéoporose post-ménopausique est en grande partie expliquée par la disparition des œstrogènes à cette période de la vie.

2.2.4.2. **Cortisol**

II freine la minéralisation de l'os ainsi que la synthèse de la trame protéique. Par ailleurs, il diminue l'absorption intestinale du calcium.

3. Exploration du métabolisme phosphocalcique

Elle revêt une importance fondamentale, en particulier dans les affections squelettiques car les renseignements cliniques et radiologiques sont souvent peu suggestifs.

Il existe des méthodes d'exploration statique et dynamique.

3.1. Exploration statique

Le métabolisme déjà décrit permet de comprendre la liste des dosages répertoriés dans le tableau 3.1 et permettant l'exploration statique de ce métabolisme.

Ces dosages ne doivent pas être demandés systématiquement mais sélectionnés en fonction de l'état clinique et des résultats de la calcémie et de la phosphorémie.

Certains dosages peuvent être réalisés dans la plupart des laboratoires (calcémie, phosphorémie, exploration de l'élimination rénale du calcium et du phosphore, phosphatases alcalines) et permettent une première orientation. Tous les autres dosages sont réalisés par des laboratoires plus spécialisés.

3.1.1. Calcium et phosphore sanguins

Ils rentrent le plus souvent dans le cadre des bilans standards et permettent dans un grand nombre de cas de dépister une pathologie du métabolisme phosphocalcique.

3.1.2. Exploration de l'élimination rénale du calcium

- *La calciurie des 24 heures* présente l'inconvénient du prélèvement urinaire sur cette période, avec souvent des pertes d'urines difficilement mesurables.

Tableau 3.1 • Dosages d'exploration statique du bilan phospho-calcique

Sang		Urines	
Examen	**Valeur de référence**	**Examen**	**Valeur de référence**
Calcémie	**2,15-2,55 mmol/1**	**Calciurie des 24 h**	**2,5-10 mmol/24 h**
Calcium ionisé	**1,17-1,30 œmol/1**		
Phosphatémie	**0,8-1,3 mmol/1**	**Phosphaturie des 24 h**	**10-30 mmol/24 h**
Marqueurs du remodelage osseux			
Phosphatases alcalines	*****	**Hydroxyprolinurie**	**75-300 µmol/24 h**
Propeptide C-terminal du procollagène 1 **		**Pyridinolines ****	
Ostéocalcine	**2-10 µg/l**	**Télopeptides C et N-terminaux ****	
Facteurs de régulation du métabolisme phospho-calcique			
Parathormone (1-84)	**10-55 ng/1**	**AMPc total**	**2-6 |JimoV24 h**
Calcitonine	**8-35 ng/1**	**AMPc néphrogénique**	**1,5-2,5 µmol/24h**
Métabolites de la vitamine D_3			
25-OH D_3	**7-35 µg/l**		
Calcitriol	**20-96 ng/1**		
AMPc	**14-23 nmol/1**		

* La valeur de référence dépend de la méthode employée. Au CHU de Toulouse (Rangueil) les valeurs de référence sont les suivantes : 30-125 UI à 37° C.
** **Les valeurs de** référence dépendent de la méthode employée.

- Afin d'éviter les erreurs dues au recueil des urines, il est plus facile de rapporter **la concentration urinaire de calcium d'un échantillon d'urines à la concentration de créatinine du même échantillon.**

Ce rapport dénommé « *indice de Nordin* » reflète assez fidèlement le calcium libéré par la résorption osseuse, surtout si le patient était à jeun depuis la veille au soir et si le recueil des urines se pratique le matin le plus souvent entre 8 h et 10 h. **Ce** rapport est habituellement compris entre 0,08 et 0,25 si les concentrations sont exprimées en mg/1. Un indice plus élevé est le témoin d'une ostéolyse accrue.

3.1.3. Exploration de l'élimination rénale des phosphates

L'élimination urinaire des phosphates dépend pour une bonne part des apports alimentaires. En l'absence d'un contrôle strict de l'alimentation d'un patient, il est de bonne règle de refaire les examens trois jours d'affilée. Diverses explorations peuvent être demandées.

- *La phosphaturie des 24 heures* présente le même inconvénient pour le recueil des urines que la calciurie, avec en plus la fluctuation due à l'alimentation.
- Dans ces conditions on peut calculer l'« indice de Nordin » qui correspond

au rapport des concentrations urinaires (en mg/1) des phosphates sur la créatinine. Le prélèvement est le même que celui du calcium et les valeurs usuelles sont comprises entre 0,3 et 0,8.

- *La clairance des Pi* peut être un test intéressant à condition de soumettre le malade à un régime phosphore bien défini. Elle se calcule suivant la formule suivante :

$$C = \frac{U\,(Pi) \times V}{P\,(Pi)}$$

U (Pi) = concentration urinaire des Pi
V = volume urinaire par unité de temps
P (Pi) = concentration plasmatique des Pi

- *L'excrétion fractionnelle des **Pi*** rapporte la clairance du phosphore à la clairance de la créatinine. Ceci permet d'éliminer les fluctuations de la clairance du phosphore dues aux variations du flux glomérulaire lequel est évalué par la clairance de la créatinine.

$$\frac{\text{Clairance du phosphore}}{\text{Clairance de la créatinine}} = \frac{\text{P créatinine}}{\text{P phosphore}} \times \frac{\text{U phosphore}}{\text{U créatinine}}$$

Cette excrétion fractionnelle correspond au phosphore filtré qui n'est pas réabsorbé par les tubules rénaux. Elle n'est pas interprétable en soi mais permet de calculer le RTP % et le PEI de Nordin définis ci-dessous.

- *L'indice de réabsorption tabulaire des Pi (RTP %)* correspond au pourcentage de phosphore filtré et réabsorbé. Il se calcule d'après la formule suivante :

RTP % Pi = (1 - excrétion fractionnelle des Pi) x 100

L'indice normal est de 85 à 95 %.

- *L'indice d'excrétion du phosphore (PEI)* de Nordin tient compte du phosphore sanguin. Il se calcule en utilisant la formule suivante :

Excrétion fractionnelle des Pi - 0,055 x P (Pi) + 0,07

Le résultat physiologique doit être : - 0,09 < PEI < + 0,09 en exprimant le P (Pi) en mg/100 ml (mmol/1 x 31 = mg/1).

3.1.4. Dosage du calcum ionisé

Le taux des protéines affectant la valeur du calcium total et **le calcium ionisé étant le calcium physiologiquement actif,** son dosage est indispensable pour affirmer une pathologie du métabolisme phosphocalcique.

Il est nécessaire dans tout changement quantitatif (myélomes...) **ou** qualitatif des protéines (brûlés, dénutrition, syndrome néphrotique, affections malignes...), dans toute modification de l'équilibre acidobasique (insuffisance rénale...) ou par la présence d'anions susceptibles de complexer le calcium (présence de citrate dans les sangs transfusés).

3.1.5. Activité des phosphatases alcalines

Dans le plasma, les phosphatases alcalines peuvent être de diverses origines et il est assez difficile d'isoler avec précision celles qui sont d'origine osseuse.

L'activité globale des phosphatases alcalines plasmatiques dépend du réactif utilisé, et de la température de mesure. Chaque laboratoire possède donc ses valeurs de référence. Cf. chapitre 10.

Les phosphatases alcalines osseuses ont comme origine les ostéoblastes. Une activité accrue de ces cellules lors de la construction osseuse a pour reflet une augmentation de l'activité des phosphatases alcalines (par exemple chez l'enfant pendant sa croissance). Tout renouvellement osseux important et accéléré se traduira par le même signe.

Cependant c'est un test peu sensible. Les deux pathologies osseuses au cours desquelles on voit une augmentation importante des phosphatases alcalines sont l'ostéomalacie et la maladie de Paget. Celle-ci présente cycliquement une destruction osseuse importante suivie d'une reconstruction anarchique de l'os.

3.1.6. Ostéocalcine

Cette protéine non collagénique de l'os est de découverte récente.

Elle est synthétisée par les ostéoblastes en même temps que les phosphatases alcalines. C'est un **témoin fiable de l'activité du remodelage osseux.**

Elle est augmentée dans les affections caractérisées par un hyper-remodelage osseux (maladie de Paget, métastases osseuses, hyperparathyroïdie primitive, ostéodystrophie rénale) et diminuée dans celles qui présentent un hyporemodelage (hypoparathyroïdie).

3.1.7. Propeptide C-terminal du procollagène 1

C'est un marqueur de formation du collagène 1 et donc de l'os. Son élimination est hépatique et une insuffisance de cet organe peut entraîner une augmentation sans rapport avec la synthèse osseuse.

3.1.8. Hydroxyprolinurie (OHp)

L'hydroxyproline urinaire a été le marqueur de résorption le plus utilisé. Cependant ce dosage est peu spécifique de la résorption osseuse car l'élimination urinaire de cette molécule représente une fraction seulement de tout le catabolisme du collagène de l'organisme. Par ailleurs la dégradation de certaines molécules autres que le collagène peut aboutir à une élimination de cet acide aminé.

On lui préfère maintenant d'autres marqueurs comme les télopeptides terminaux et les pyridinolines

3.1.9. Télopeptides C et N-terminaux

Ils constituent des marqueurs sensibles et spécifiques de la résorption osseuse. Ils sont constitués d'une courte chaîne polypeptidique qui peut être ou non associée à un pont pyridinoline ou désoxypyridinoline. Avec les pyridinolines ils permettent de mettre en évidence une perte osseuse importante. Dans le cadre de la ménopause ils aident au dépistage des femmes ayant un risque ostéoporotique majeur afin de les faire bénéficier d'un traitement préventif. Ils offrent, de plus, la possibilité de suivre l'efficacité d'un traitement chez une femme ménopausée.

3.1.10. Pyridinolines (se reporter à la figure 3.4)

Ce sont des marqueurs de destruction osseuse. Ce terme de pyridinolines regroupe en fait 2 types de molécules de pontage : les pyridinolines proprement dites et les désoxypyridinolines. Ces molécules de pontage peuvent être associées à des peptides (forme liée) ou non (forme libre).

- le pont pyridinoline, qui peut être du coté C ou N-terminal, associe 3 résidus hydroxylysyl. Il est retrouvé plus spécifiquement dans l'os et le cartilage.

- Le pont désoxypyridinoline, lui aussi du côté Cou N-terminal, associe 2 résidus hydroxylysyl à un résidu lysyl. Il est retrouvé plus spécifiquement dans l'os.

Actuellement les techniques immunoenzymatiques permettent le dosage en bloc des pyridinolines ou le dosage des désoxypyridinolines libres.

Ils ont la même valeur diagnostique dans l'ostéoporose que les télopeptides.

3.1.11. Dosage de la parathormone

Actuellement, le dosage s'effectue par une technique radio-immunométrique et permet de déterminer le taux de PTH intacte c'est-à-dire de PTH 1-84. Les réactions croisées avec les fragments sont totalement éliminées et les dosages de ces fragments n'ont plus d'intérêt.

Certaines pathologies (voir les hypercalcémies) voient la sécrétion d'un peptide, le PTH-rp *(PTH related peptide)* ayant dans sa partie NH_2 terminale 8 des 13 premiers acides aminés de la PTH ce qui lui permet une liaison aux récepteurs de la PTH et donc lui octroie toute l'activité biologique de la PTH (activité *Fîîî-like)* sans pour autant être reconnu par les anticorps de la technique radio-immunométrique.

Ce dosage permet donc de faire la différence entre les hypercalcémies par hyperparathyroïdie dans lesquelles la PTH est augmentée, et les hypercalcémies dues à la sécrétion d'une PTH-rp (hypercalcémies paranéoplasiques) qui ont un taux bas de PTH.

3.1.12. AMP cyclique néphrogénique

L'AMPc urinaire est constitué de l'AMPc filtré et non reabsorbé, augmenté de l'AMPc sécrété par les cellules tubulaires rénales sous l'influence de la PTH (AMPc néphrogénique).

Le taux de *VAMPc néphrogénique* est un bon reflet de la sécrétion de l'hormone parathyroïdienne.

L'AMPc néphrogénique se calcule par la différence entre l'AMPc excrété et l'AMPc filtré dans le même temps.

L'AMPc *excrété* se calcule en faisant le produit du débit urinaire par le taux de l'AMPc urinaire.

L'AMPc *filtré* se calcule en faisant le produit de la filtration glomérulaire (exprimée par la clairance à la creatinine) par le taux de l'AMPc sanguin.

L'intérêt biologique de la détermination de l'AMPc réside dans le cadre des hypercalcémies paranéoplasiques avec sécrétion de PTH-rp. En effet chez celles-ci l'hypercalcémie s'accompagne d'un dosage de la parathormone normal ou abaissé. Une augmentation de l'AMPc est en faveur d'une sécrétion de PTH-rp.

Il existe cependant depuis peu un dosage de la PTH-rp qui permettra le diagnostic de ces pathologies.

3.1.13. Dosage de la calcitonine

Encore peu demandé, il peut cependant être réalisé dans certains laboratoires spécialisés.

3.1.14. Dosages des métabolites de la vitamine D_3

Le dosage séparé du 25-OH D3 et du calcitriol (la, 25-diOH D3) permet de faire la différence entre les hypocalcémies dues à un défaut d'apport ou d'ensoleillement (25-OH D3 bas) et les hypocalcémies dues à un défaut du métabolisme de la vitamine (25-OH D3 normal et calcitriol bas). Certaines hypocalcémies peuvent être dues à un défaut d'utilisation du calcitriol (25-OH D3 normal et taux élevé de calcitriol).

3.2. Exploration dynamique

La qualité et la diversité des différents dosages exposés dans l'exploration statique a permis de diminuer la batterie des tests dynamiques autrefois très nombreux. Les rares tests dynamiques qui sont encore pratiqués ne font que préciser et compléter les informations obtenues par les dosages.

3.2.7. *Épreuve à la PTH exogène*

Cette épreuve consiste à administrer 100 unités/m^2 de surface corporelle de PTH et à suivre la réponse tubulaire rénale par l'exploration de la réabsorption des phosphates et la sécrétion de l'AMPc néphrogénique.

Ce test permet de faire la différence entre l'hypoparathyroïdie dans laquelle la sécrétion de PTH est diminuée et la pseudohypoparathyroïdie qui voit une sécrétion quantitativement normale de PTH mais une insensibilité des organes cibles à cette hormone. Une interprétation plus précise de ce test sera faite avec les hypocalcémies pseudoparathyroïdiennes.

3.2.2. *TestdePAK*

Ce test se fait chez un sujet présentant une hypercalciurie avec lithiase rénale et pour lequelle *aucune cause n'a pu être retrouvée* (tous les autres tests statiques sont normaux).

Pendant 10 jours, on soumet le patient à un régime pauvre en calcium.

Le 1 lème jour on détermine sur une miction sa calciurie de base, soit Ça Ul, on lui fait ingérer 1 g de calcium et 4 heures après sa calciurie est mesurée, soit CaU2.

Si Ça Ul est augmentée et si Ça U2 est très augmentée, l'hypercalciurie est d'origine rénale (le rein n'est pas capable de réabsorber le calcium).

Si Ça Ul est normale et si Ça U2 est très augmentée, l'hypercalciurie est d'origine digestive (le tube digestif absorbe trop de calcium).

3.2.3. *Hypercalciurie provoquée*

Ce test n'est plus qu'exceptionnellement pratiqué. Il permet de faire la différence entre les ostéomalacies et les ostéoporoses (voir les perturbations métaboliques de l'os).

Il consiste en l'injection de 180 mg de calcium sous forme de gluconate chez un patient dont on connaît la calciurie de base. La calciurie de ce sujet est déterminée pendant les 24 heures qui suivent l'injection du gluconate de calcium.

Un sujet normal doit éliminer environ 40 à 45 % du calcium injecté.

Un sujet présentant une ostéomalacie fixera au niveau de l'os pratiquement tout le calcium injecté et 5 à 10 % seulement de celui-ci se retrouveront dans les urines.

Un sujet ostéoporotique est incapable de fixer le calcium et ses urines contiendront environ 70 à 80 % de la dose injectée.

4. Variations pathologiques

4.1. Variations de la calcémie

4.1.1. Hypercalcémies

Elles correspondent à une calcémie supérieure à 2,55 mmol/1 avec un taux de protéines normal. Dans le cas contraire l'affirmation de l'hypercalcémie se fera sur le résultat du calcium ionisé.

Cliniquement on peut trouver :

- des signes digestifs : anorexie, nausées, vomissements ;
- des signes neurologiques : asthénie physique et psychique pouvant aller jusqu'au coma ;
- des signes cardiovasculaires : troubles du rythme, hypertension.

Ces signes n'ont pas de caractères spécifiques et sont souvent méconnus si la calcémie n'est pas dosée.

Au point de vue étiologique, elles peuvent être classées en :

- hypercalcémies néoplasiques (60 % des hypercalcémies) ;
- hypercalcémies non néoplasiques (40 % des hypercalcémies).

4.1.1.1. Hypercalcémies néoplasiques

L'hypercalcémie constitue une complication fréquente des néoplasies et apparaît assez tard dans l'évolution. Elle est toujours due à une augmentation de la résorption osseuse, celle-ci pouvant être due à une *ostéolyse locale* engendrée par la tumeur ou à une sécrétion par la tumeur d'un *peptide « PTH-like »* ayant toutes les fonctions biologiques de la PTH.

L'hypercalcémie sera responsable d'une diminution de la sécrétion de PTH accompagnée d'une diminution du calcitriol.

La diminution de la réabsorption rénale du calcium (due à l'abondance du calcium filtré) permet de lutter contre l'hypercalcémie, mais le rein ne peut s'adapter que dans une certaine limite au-delà de laquelle une insuffisance rénale peut survenir.

• ***Les** hypercalcémies néoplasiques par ostéolyse locale (10 % des hypercalcémies)*

- *Tumeurs solides avec métastases osseuses ; principalement **cancer du sein** chez la femme, mais aussi dans les deux sexes, cancers du **poumon,** du **rein,** de la **thyroïde.***

La résorption osseuse est due soit à l'action des cellules carcinomateuses elles-mêmes, soit à l'action des ostéoclastes activés par certains peptides synthétisés par les cellules cancéreuses ou les cellules inflammatoires qui sont autour des métastases.

- *Myélomes multiples.*

La résorption osseuse est due à une hyperactivité ostéoclastique vraisembla-

blement en rapport avec la sécrétion par les cellules myélomateuses d'activateurs des ostéoclastes appelés OAF (osteoclast activating factors).

- ***Les hypercalcémies paranéoplasiques par sécrétion d'unpeptide PTH-like (50 % des hypercalcémies).***

Très souvent au cours d'un certain nombre de cancers *(larynx, pharynx, poumon, col utérin, vulve, peau, rein, vessie, ovaire)* les cellules carcinomateuses peuvent sécréter un peptide qui possède 141 AA et dont la partie NH_2 terminale comporte 8 des 13 premiers AA de la PTH. Ceci lui permet de se lier aux récepteurs de la PTH et lui donne toute l'activité biologique de la PTH. Cependant la technique de dosage qui prend en « sandwich » la PTH entre deux anticorps ne reconnaît pas la *PTH-like* (la partie NH_2 terminale est reconnue mais non la partie COOH terminale).

Cette substance parathormone-like disparaît avec l'ablation de la tumeur néoplasique.

4.1.1.2. Hypercalcémies non néoplasiques

- ***Hyperparathyroïdie primitive (25 % des hypercalcémies)***

La sécrétion exagérée de PTH est le plus souvent due à un adénome parathyroïdien, plus rarement à un cancer.

L'hypercalcémie est la résultante de l'action de la PTH et de l'augmentation de la synthèse de calcitriol. En effet l'excès de PTH est responsable d'une diminution de la réabsorption rénale des phosphates se traduisant par une hypophosphorémie, à son tour responsable (avec la PTH) de l'augmentation de synthèse du calcitriol. Malgré la réabsorption intense du calcium la calciurie est augmentée, conséquence d'une filtration glomérulaire trop importante.

- ***Causes rares d'hypercalcémie***

- *Intoxication par la vitamine D :* peut se voir dans les traitements chroniques par les dérivés de cette vitamine.

- *La sarcoïdose de Besnier-Boeck-Shaumann :* on attribue l'hypercalcémie à une augmentation de la synthèse du calcitriol par les cellules du tissu sarcoïdien.

- *La maladie des buveurs de lait :* l'hypercalcémie est observée chez des patients ulcéreux traités par des produits alcalins et buvant beaucoup de lait (le lait par son alcalinité lutte contre la douleur).

- *Hyperthyroï'die :* 20 % des hyperthyroïdies s'accompagnent d'une hypercalcémie dont serait responsable l'augmentation du remodelage osseux dû aux hormones thyroïdiennes.

- *L'immobilisation prolongée :* elle peut entramer une diminution de la formation osseuse au profit de la résorption.

- *Insuffisance rénale chronique au stade terminal :* la physiopathologie de celle-ci sera exposée avec l'hypocalcémie de l'insuffisance rénale.

4.1.2. Hypocalcémies

Elles correspondent à une calcémie inférieure à 2,15 mmol/1, pour une protidémie normale. L'affirmation de l'hypocalcémie se fera ici aussi par le dosage du calcium ionisé.

Cliniquement on trouve des signes d'hyperexcitabilité neuromusculaire donnant au maximum, surtout chez l'enfant, le syndrome tétanique.

L'intensité des manifestations cliniques dépend en grande partie de la brutalité des changements de la calcémie, les diminutions lentement progressives étant assez bien supportées.

Les *étiologies* permettent de les classer en :

- hypocalcémies extraparathyroïdiennes ;
- hypocalcémies parathyroïdiennes ;
- hypocalcémies pseudoparathyroïdiennes.

4.1.2.1. *Hypocalcémies extraparathyroïdiennes*

Elles peuvent être dues à un défaut d'apport en calcium, à un défaut de **son** absorption digestive ou à un défaut de sa réabsorption rénale.

La diminution des apports est extrêmement rare sous nos climats, puisque même un régime dépourvu d'apports laitiers apporte le minimum nécessaire pour avoir un bilan nul.

Les carences en dérivés de la vitamine D sont responsables du **rachitisme** chez l'enfant et de **l'ostéomalacie** chez l'adulte.

Elles peuvent être dues à :

- une carence d'apport, surtout dans les pays sous développés ;
- une carence en exposition au soleil, plus fréquente chez les sujets âgés ;
- une malabsorption : maladie cœliaque, malabsorption des graisses et des vitamines liposolubles, affections biliaires ;
- une perturbation dans le métabolisme de la vitamine **D,** (absence d'hydroxylation hépatique ou rénale).

Certains patients n'ont pas de carence en vitamine D, mais il existe chez eux une résistance, une insensibilité des récepteurs au calcitriol. Ces hypocalcémies vitamino-résistantes ne sont pas améliorées par l'apport de vitamine D.

L'insuffisance rénale chronique est la conséquence de la réduction de volume de la masse néphronique. Celle-ci s'accompagne de la réduction de la filtration glomérulaire ainsi que de la diminution de la synthèse de la la hydroxylase. La diminution du nombre de néphrons est responsable de la moindre filtration des Pi et de l'augmentation du taux sanguin de ce derniers.

L'hypocalcémie qui est le résultat de la diminution du calcitriol et du dépôt de phosphate de calcium dans les tissus mous (vraisemblablement dû à l'hyperphos-

phorémie) est responsable d'une hypersécrétion de PTH développant une hyperparathyroïdie secondaire.

Il semble maintenant admis qu'il existerait, à la longue chez ces malades, une pérennité de cette hyperparathyroïdie secondaire avec hyperrésorption de l'os, responsable, surtout si la diminution du calcitriol n'est pas trop importante, d'un remaniement osseux important correspondant à une ostéite fibreuse.

Ce syndrome est appelé **ostéodystrophie rénale** et l'hypocalcémie du début peut faire place à une hypercalcémie à la fin de l'évolution.

Un trouble idiopathique de la réabsorption du calcium peut être responsable d'une hypocalcémie. Ces patients, pour une raison inconnue, ne réabsorbent pas le calcium et sont atteints d'hypercalciurie.

4.1.2.2. Hypocalcémies parathyroïdiennes

Elles sont dues à un déficit de sécrétion de la PTH et associent hypocalcémie et hyperphosphorémie. Citons :

- *l'hypoparathyroîdie primitive idiopatique* (de cause inconnue) ;
- *l'hypoparathyroîdie chirurgicale,* après ablation des parathyroïdes.

4.1.2.3. Hypocalcémies pseudoparathyroïdiennes

II s'agit de pathologies dans lesquelles la sécrétion de PTH s'effectue normalement, mais l'hormone n'a aucune action périphérique. On retrouve toujours dans ces cas de pseudohypoparathyroïdies une augmentation de la PTH plasmatique en réaction à l'hypocalcémie.

Ces pseudohypoparathyroïdies peuvent s'expliquer par :

- *une PTH anormale (mais cependant dosable) ;*
- *un défaut de sécrétion de l'AMPc en réponse à la sécrétion de la PTH ;*
- *un défaut de réponse à l'AMPc des organes cibles périphériques.*

La distinction des hypocalcémies parathyroïdiennes et pseudoparathyroïdiennes se fait, après dosage de la PTH 1-84, par le test à la PTH exogène en dosant, après l'injection de l'hormone, l'AMPc et la phosphaturie. Les éléments du diagnostic différentiel sont regroupés dans le tableau 3.2.

4.2. Variation de la phosphorémie

4.2.1. Hyperphosphorémies

Elles correspondent à **une phosphorémie supérieure à 1,5 mmol/1.**

Les trois principales causes sont :

- *Insuffisance rénale*

Elle correspond à une diminution de la filtration rénale au niveau des glomérules. Elle peut entraîner des hyperphosphorémies très importantes allant jus-

qu'à 3,80 mmol/1. Cependant l'hyperphosphorémie de l'insuffisance rénale est très variable.

• ***Maladies endocriniennes***

- *Hypoparathyroïdie* associant hyperphosphorémie et hypocalcémie. Le pourcentage de phosphore réabsorbé par le tube rénal est élevé malgré l'hyperphosphorémie.
- *L'acromégalie* s'accompagne souvent d'une phosphorémie élevée ou à la limite supérieure de la normale.
- *Au cours des diabètes graves,* on peut également observer une hyperphosphorémie que l'on peut expliquer par la diminution de la consommation de phosphore lié au défaut d'utilisation des glucides.

• *Affections diverses*

- L'hyperphosphorémie a été également signalée dans les suites immédiates de fractures multiples et souvent au cours de l'intoxication par la vitamine D.

Tableau 3.2 • Diagnostic différentiel des hypocalcémies hypoparathyroïdiennes et pseudohypoparathyroïdiennes.

	PTH 1-84	**AMPc**	**Pi Urinaires**
		après injection de PTH exogène	
Hypoparathyroïdie	↘	↗	↗
Pseudohypoparathyroïdie (PTH anormale)	↗	↗	↗
Pseudohypoparathyroïdie (défaut sécrétion AMPc)	↗	**pas de changement**	**pas de changement**
Pseudohypoparathyroïdie (défaut réponse périphérique)	↗	↗	**pas de changement**

4.2.2. Hypophosphorémies

Elles correspondent à une **phosphorémie inférieure à 0,8 mmol/1.**

• ***Hyperparathyroïdie***

Elle détermine une hypophosphorémie par fuite urinaire du phosphore. Malgré la diminution de la phosphorémie, le pourcentage du phosphore réabsorbé est inférieur à la normale.

Lorsque l'hyperparathyroïdie a entraîné une insuffisance rénale, l'hypophosphorémie fait place à une hyperphosphorémie, le rein ne pouvant plus excréter tout le phosphore en provenance de la lyse osseuse.

• ***Ostéomalacies nutritionnelles (vitaminosensibles)***

La diminution de la vitamine D circulante par manque d'apport vitaminique entraîne une hypophosphatémie et une hypocalcémie. L'hyperparathyroïdie secondaire qui en resuite ne fait qu'augmenter la fuite de phosphore et donc aggrave l'hypophosphorémie.

• ***Ostéomalacies vitaminorésistantes***

- *Hypophosphorémie du syndrome de Fanconi ou diabète phosphoglucoaminé.* C'est un trouble primitif de la réabsorption du phosphore au niveau des cellules tubulaires rénales.
- *Certaines entéropathies avec atrophie de la muqueuse intestinale* entraînent une hypovitaminose D responsable d'une hyperparathyroïdie secondaire.
- *Rachitisme familial hypophosphorémique vitaminorésistant.* Il s'agit d'une résistance périphérique des organes cibles à la vitamine D de cause inconnue.

• ***Causes diverses***

- *Perfusion de glucose ou de fructose* par stimulation de la glycolyse.
- *Reminéralisations très rapides* dans les traitements d'une ostéomalacie ou après parathyroïdectomie.

4.3. Perturbations métaboliques de l'os

Ce sont essentiellement les syndromes d'hyper et d'hypo-ostéoïdose.

4.3.1. Ostéomalacie ou hyperostéoïdose

C'est une maladie osseuse dans laquelle il y a un **défaut de minéralisation** du tissu ostéoïde.

Celui-ci est en trop grande proportion par rapport au volume osseux global qui est respecté car les travées et les corticales ont une épaisseur normale.

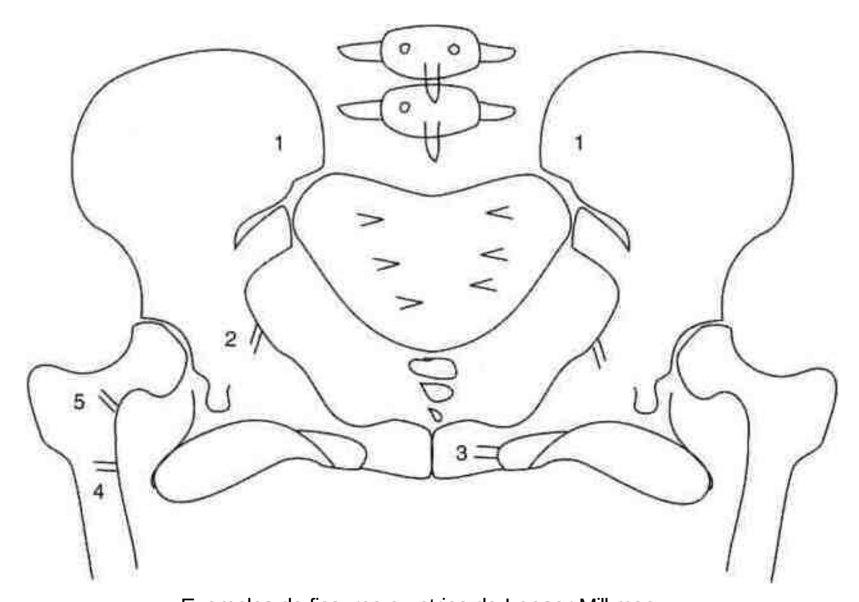
Tout se passe comme si l'organisme réagissait à un défaut de minéralisation par un accroissement de synthèse du tissu ostéoïde, aboutissant à un tissu osseux ramolli.

Cette absence de minéralisation est la conséquence, dans la majorité des cas, d'une carence en vitamine D : c'est l'équivalent chez l'adulte du rachitisme chez l'enfant. Elle est vitamino sensible et curable par l'apport de vitamine D.

Elle se traduit :

Du point de vue clinique par des **douleurs** et une **impotence** fonctionnelle qui sont les principaux signes.

Du point de vue radiologique par une **déminéralisation** importante et les **stries de Looser Milkman.** Ces dernières (figure 3.11) sont des fissures radio-transparentes symétriques siégeant électivement au niveau du bassin et des fémurs.



Exemples de fissures ou stries de Looser Milkman :
(1) fissure iliaque postérieure ; (2) fissure ilio pubienne ; (3) fissure ischio-pubienne ;
(4) fissure corticale fémorale ; (5) fissure au niveau du col fémoral

Figure 3.*11* • Aspect radiographique de l'ostéomalacie du bassin.

Du point de vue biologique on trouve régulièrement les signes suivants :
- hypocalcémie et ou hypophosphorémie ;
- hypocalciurie et ou hypophosphaturie ;
- augmentation des phosphatases alcalines et de l'ostéocalcine.

4.3.2. Ostéoporose ou hypo-ostéoidose

Elle correspond à une involution progressive de l'os aussi bien dans sa partie protéique que dans sa partie minérale. Elle est caractérisée par un volume total osseux diminué (figure 3.12), mais constitué par un os qualitativement normal. Les proportions de tissu calcifié et de tissu ostéoïde sont respectées. Ce n'est donc pas une déminéralisation vraie même si la quantité de tissu calcifié est inférieure, quantitativement, à la normale.

Elle aboutit à un os poreux et fragile dont les travées et les corticales sont amincies.

Du point de vue clinique, elle se traduit par une très grande fragilité du squelette responsable très souvent de tassements vertébraux et de fractures (col du fémur en particulier).

Du point de vue radiologique on trouve une déminéralisation osseuse diffuse.

Du point de vue biologique cette pathologie change actuellement de visage. Si les tests classiques (calcémie, phosphorémie) sont le plus souvent normaux,

les tests de remodelage osseux (voir ce chapitre) permettent de mieux différencier les ostéoporoses à évolution rapide.

Cette maladie concerne dans 90 % des cas la femme ménopausée et est encore d'origine mal connue, même si l'arrêt des sécrétions œstrogéniques semble jouer un rôle prépondérant, expliquant l'intérêt du traitement hormonal substitutif après la ménopause.

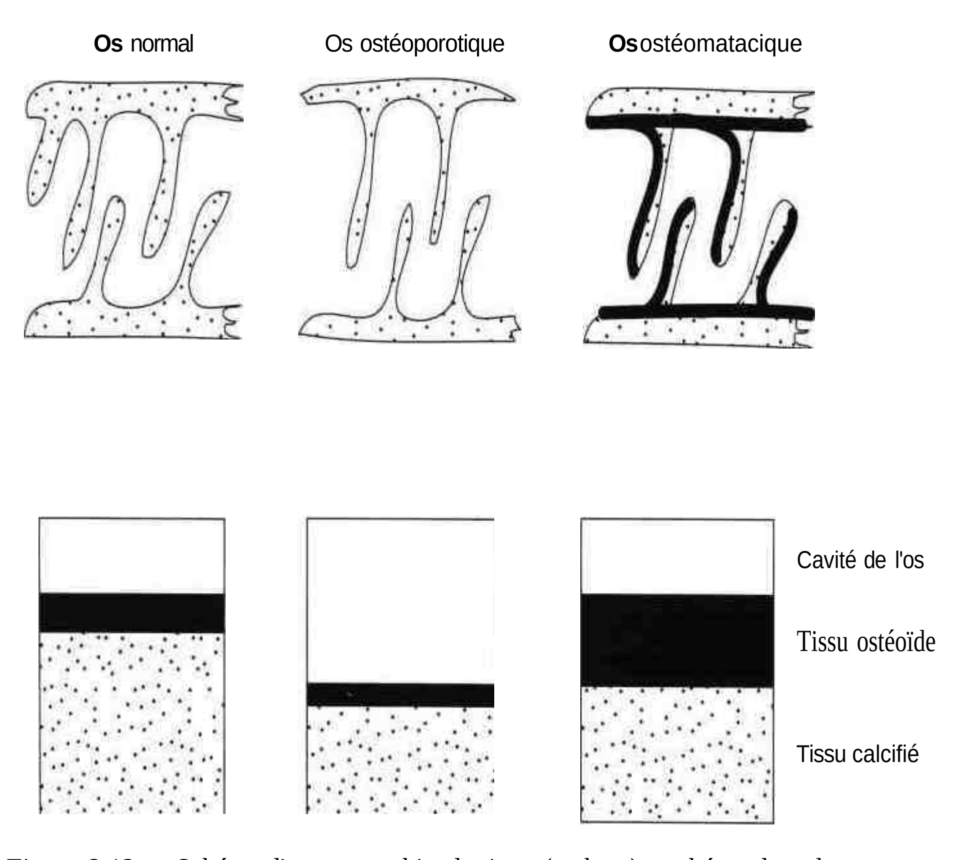


Figure 3.12 • Schéma d'une coupe histologique (en haut) ; schéma du volume osseux absolu (en bas).
(D'après P. Le Goff : Ostéoporose. Des traitements encore controversés. hnpact-Le praticien PPP n° 15.)

Cependant un certain nombre d'ostéoporoses sont secondaires et reconnaissent une cause :
- corticothérapie au long cours ;
- hypercorticisme spontané ;
- hyperthyroïdie ;
- immobilisation prolongée.

5. *Méthodes de dosage*

5.1. Dosage de la calcémie

5.1.1. Méthodes calorimétriques

Elles utilisent différentes substances qui complexent le calcium en formant un dérivé dont la coloration est proportionnelle à la concentration de calcium de l'échantillon à doser. Il est nécessaire **d'éliminer l'interférence du magnésium** en utilisant l'hydroxyquinoléïne et en travaillant à pH alcalin.

Ces méthodes se prêtent bien à une adaptation sur les appareils automatiques multiparamétriques de biochimie.

5.1.1.1. *Orthocrésolphtaléine*

L'orthocrésolphtaléine complexon se **complexe** en milieu alcalin avec le calcium pour donner un dérivé rouge présentant un maximum d'absorption à 575 nm.

5.1.1.2. Bleu de *méthyl thymol*

Ce réactif chélate le calcium et vire au bleu avec un maximum d'absorption à 612 nm.

5.1.1.3. Arsenazo III

Le complexe coloré en noir présente un maximum d'absorption à 680 nm.

5.7.2. *Méthodes physiques*

5.1.2.1. Spectrophotométrie d'absorption atomique

C'est actuellement la méthode de référence pour le dosage du calcium.

La longueur d'onde utilisée est de 422,7 nm et la technique demande le rajout de chlorure de lanthane pour éviter l'interférence des phosphates.

Ce dosage s'effectue sur un appareillage onéreux, et peu de laboratoires de biochimie de routine l'emploient.

Le schéma de principe d'un **spectrophotomètre d'absorption** atomique est présenté sur la figure 3.13.

Un faisceau lumineux spécifique émis par la lampe à cathode creuse est absorbé par les atomes de calcium de l'échantillon qui ont été amenés sur son trajet par le générateur de vapeur atomique. Il existe un rapport entre le nombre d'atomes ayant absorbé et l'intensité du faisceau après le générateur. Le mono-chromateur sélectionne la longueur d'onde du dosage (ici 422,7 nm). Le modu-lateur permet d'éliminer certaines émissions parasites indésirables. Le photo-

multiplicateur et l'électronique associée permettent, après calibration de transformer le résultat en concentration.

5.1.2.2. Photométrie à l'émission de flamme

Son principe a été décrit dans le chapitre 1.

Les appareils permettant le dosage du sodium, du potassium et du lithium par cette méthode utilisent, pour la plupart, une flamme propane/air qui n'est pas assez chaude pour permettre l'excitation des atomes de calcium.

Dans ces conditions il est nécessaire, si l'on veut doser le calcium par cette technique, d'acquérir un photomètre de flamme utilisant le mélange acétylène/air. Ces appareils donnent de bons résultats mais sont plus onéreux et plus rares sur le marché.

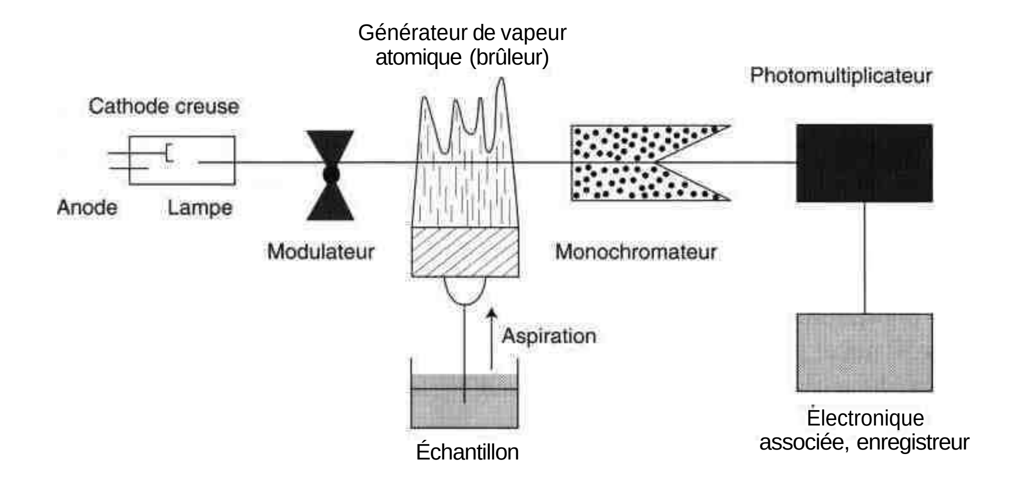


Figure 3.13 • Schéma de principe d'un spectrophotomètre d'absorption atomique.

5.1.3. Méthodes potentiométriques

Après acidification destinée à déplacer le calcium de sa liaison aux protéines et de ses complexes, le calcium total peut être mesuré par potentiométrie en utilisant une électrode sélective. Cette technique a été adaptée à certains analyseurs automatiques.

5.2. Dosage du calcium ionisé

Ce dosage a été développé ces dernières années et cette technique par életrode sélective est maintenant intégrée à des instruments dont l'utilisation est à la portée de-tous les laboratoires dans des conditions de fiabilité et de praticabilité satisfaisantes.

Le taux de calcium ionisé est variable en fonction du pH, et il est préférable de faire un prélèvement en anaérobiose pour éviter tout changement de pH par perte de CO_2.

5.3. Dosage du calcium urinaire

Si les techniques sont les mêmes que pour le sang, il est cependant nécessaire d'effectuer le recueil dans un récipient contenant de l'acide chlorhydrique 1M pour acidifier les urines ce qui permet la dissolution des sels et des complexes que le calcium peut contracter avec des anions comme les phosphates ou les oxalates. L'homogénéisation des urines est indispensable avant tout prélèvement d'un aliquot pour analyse.

5.4. Dosage des phosphates inorganiques sanguins et urinaires

Ces techniques utilisent presque toutes (à l'exception des méthodes enzymatiques) un reactif molybdique. En présence de ce réactif et en milieu acide l'ion phosphate donne un phosphomolybdate de coloration bleue **instable.**

5.4.1. Réduction du phosphomolybdate

Le phosphomolybdate réduit va donner une coloration stable pendant au moins 30 mn et permet une lecture photométrique à 660 nm.

Les réducteurs les plus utilisés sont le sulfate ferreux et l'hydroxylamine.

5.4.2. Colorimétrie directe du phosphomolybdate

L'instabilité de la coloration n'est plus un facteur critique avec les appareillages modernes dans lesquels les calibrateurs et les spécimens sont traités exactement dans les mêmes conditions. L'apparition de la coloration est suivie dans ces conditions à 340 nm.

5.4.3. Colorimétrie du phosphovanadomolybdate

Les ions phosphates en présence de molybdate et de vanadate en milieu acide vont donner une coloration jaune dont le pic d'absorption est à 360 nm. Cette technique est peu employée.

5.4.4. Méthodes enzymatiques

Plusieurs techniques ont été proposées, la plus récente est détaillée dans le schéma suivant.

$$\text{Phosphates} + \text{inosine} \xrightarrow[\text{phosphorylase}]{\text{nucléoside}} \text{hypoxanthine} + \text{ribose 1 P}$$

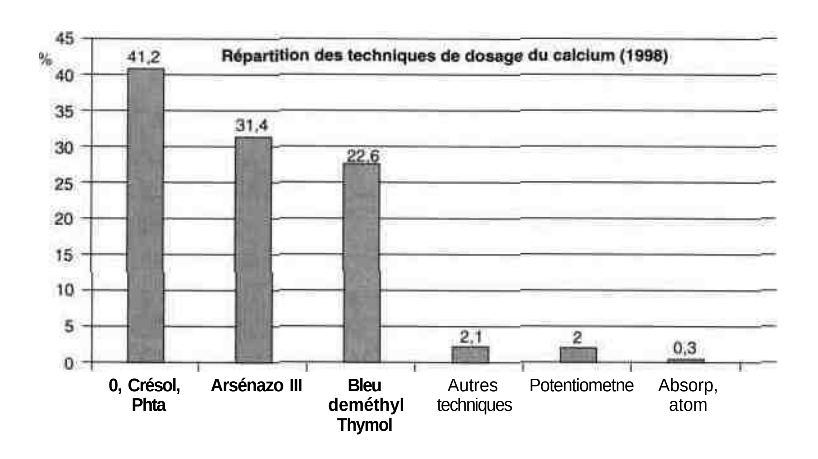
$$\text{Hypoxanthine} + 2O_2 + 2H_2O \xrightarrow[\text{oxydase}]{\text{xanthme}} \text{ac. urique} + 2H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{aminophénazone} + \text{chromogène} \xrightarrow{\text{peroxy ase}} \text{dérivé coloré} + 4H_2O$$

Ces méthodes ne sont pas très employées dans la mesure où la colorimétrie directe du phosphomolybdate donne satisfaction à un coût faible.

5.5. Répartition des techniques de dosage en 1998

Elles sont présentées dans la figure 3.14.



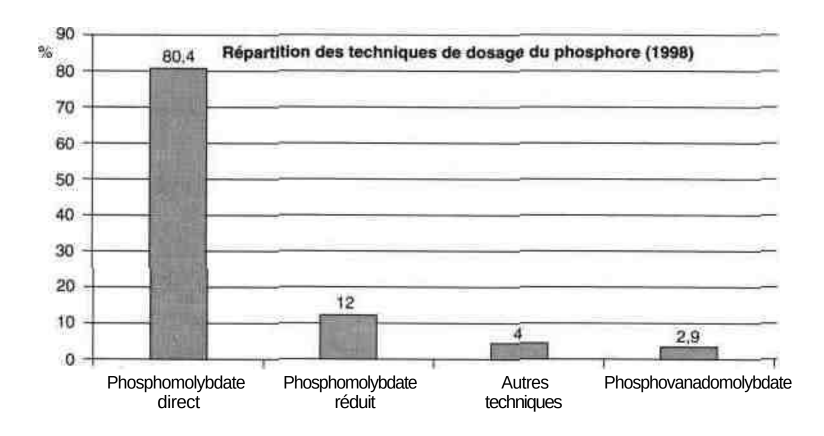


Figure 3.14 • Répartition des techniques de dosage du calcium et du phosphore.

Références bibliographiques

P. Courdon et al. *La dynamique du remodelage osseux expliquée par Harold Frost. La nouvelle presse médicale,* 1975, 40, 6.

Exploration des troubles du métabolisme phosphocalcique. Option/Bio n° 52, Eisevier, 1991.

B. Lacour. *Homéostasie phosphocalcique.* Option/Bio n° 28, Eisevier, 1990.

P. Métais et al. *Biochimie clinique,* tome 2, Simep, Paris, 1980.

P. Métais et al. *Biochimie* ***clinique,*** **tome** 3, Simep, Paris, 1988.

C. Miura. *Hypercalcémies paranéoplasiques, physiopathologie, diagnostic et traitement* Option/Bio n° 55, Eisevier, 1991.

B. Borderie, B. Cherruau, 0. Ekindjian. *Les marqueurs biochimiques de la résorption osseuse. Intérêt de leur détermination dans l'ostéoporose postménopausique. Immunoanal. Biol. Spec.* 1997 ; 12 :24-28.



4

Métabolisme du fer

Michel Lagente

Le fer (PA = 56) est le plus anciennement connu des oligoéléments, substances ainsi baptisées par Gabriel Bertrand en raison de leur faible concentration dans la matière vivante et cependant indispensables au fonctionnement des organismes vivants.

Si son rôle essentiel est d'intervenir dans l'érythropoïèse (synthèse des globules rouges), une carence martiale peut être responsable d'une sensibilité accrue aux infections, d'anomalies des épithéliums ou des phanères, ou d'une diminution des performances physiques et intellectuelles.

Tout ceci amène à considérer la place majeure du fer dans l'organisme.

1. Métabolisme du fer

1.1. Répartition dans l'organisme

Un adulte sain possède (tableau 4.1) environ 4 g de fer (71 mmoles) répartis entre *fer héminique* à l'état ferreux (Fe''1''1) et *fer non héminique* à l'état ferrique (Fe+++).

La majeure partie du fer héminique entre dans la composition de *l'hémoglobine* (60 % du fer total) alors que les réserves sous forme *deferritine* et *d'hémosidérine* possèdent un fer non héminique (35 % du fer total).

Tableau 4.1 • Répartition du fer.

- Hémoglobine	2,4 g (60 %)	FER
- Myoglobine	0,2 g (5 %)	HEMINIQUE
- Enzymes respiratoires cellulaires (cytochromes, oxydases, peroxydases, catalases, enzymes du cycle de Krebs...)	**0,01 g**	(Fe^{++})
- Fer plasmatique lié à la transferrine et fer des liquides extracellulaires	0,005 g	**FER** NON HEMINIQUE
- Fer des réserves (ferritine, hémosidérine)	1,4 g (35 %)	**(Fe^{+++})**
TOTAL	≠ 4 g	

1.2. **Cycle du fer** (figure 4. l)

Plus de la moitié du fer de l'organisme est contenu dans les globules rouges (GR) au sein de l'hémoglobine (Hb). Ce fer est à l'état ferreux (Fe"1"1").

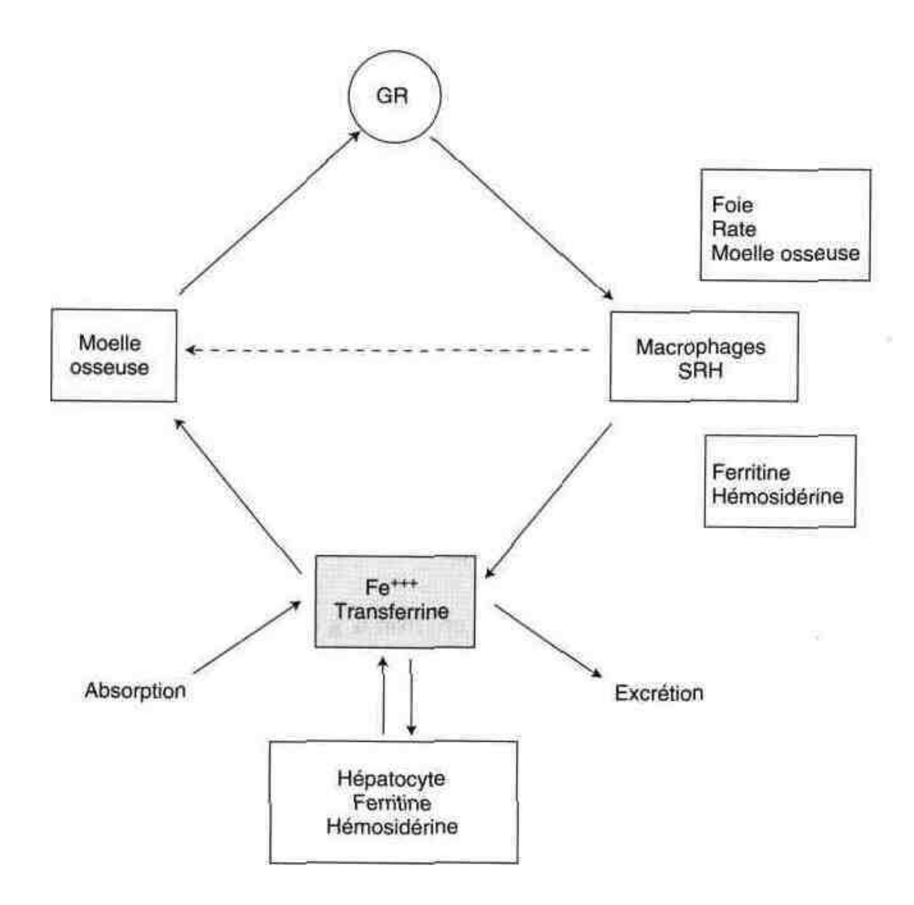


Figure 4.1 • Cycle du fer.

Les hématies vieillies sont captées par les macrophages du *système réticulo-histiocytaire* (SRH) principalement du foie, de la rate et de la moelle osseuse.

L'hémoglobine détruite va libérer le fer, dont une partie est stockée sous forme de férritine et d'hémosidérine **(Fe^{+++})** et une autre partie est libérée dans le plasma.

Le fer plasmatique est transporté par une protéine, la transferrine qui est normalement saturée au tiers de ses capacités de transport.

Le fer plasmatique peut avoir deux destinées :

- la plus importante est *son retour au niveau de la moelle osseuse* où il sera incorporé au sein des érythroblastes, cellules précurseurs des GR.
- l'autre voie permet *la mise en réserve* sous forme de férritine et d'hémosidérine dans les cellules parenchymateuses du foie (hépatocytes).

Le plasma est donc un passage obligatoire pour le fer contenu dans le SRH de la moelle osseuse et qui rentrera dans la synthèse des GR. Le phénomène de la *rophéocytose* qui est l'injection directe de la férritine des macrophages de la moelle osseuse dans les érythroblastes ne concerne en effet qu'une infime partie de cette férritine.

Le fer plasmatique est par ailleurs la voie de passage entre le fer absorbé au niveau du tube digestif, le fer mobilisé à partir des réserves et le fer éliminé au niveau des émonctoires.

Ce fer plasmatique est quantitativement très faible, de l'ordre de 20 ixmol/l, mais qualitativement très important car il est un *carrefour obligatoire* dans le cycle corporel de ce métal. Par l'intermédiaire du fer plasmatique, les échanges en fer entre les différents secteurs sont très importants car le fer circulant est renouvelé en moyenne 10 fois par jour.

13. Besoins en fer

Le fer est recyclé dans l'organisme et les besoins doivent juste compenser les pertes :

- *pertes régulières* dont la plus importante est la desquamation des cellules intestinales épithéliales. S'y associent des pertes faibles par la bile, la peau et l'urine ;
- *pertes épisodiques* liées aux hémorragies, aux pertes menstruelles, à la grossesse, à l'allaitement.

Les besoins quotidiens sont d'environ :

- 1 mg chez l'homme,
- 2 mg chez la femme en période d'activité génitale.

La grossesse demande pour la mère un apport supplémentaire de l'ordre de 3 mg/jour pour les deux premiers trimestres et de 10 mg/jour pour le dernier.

Chez l'enfant les besoins sont plus importants pendant les deux premières années et au moment de l'adolescence.

Le fer est apporté principalement par la viande, le poisson, les légumes secs, les fruits, les légumes (les aliments les plus riches sont les abats).

1.4. Absorption du fer

Elle a lieu dans le duodénum et à un degré moindre dans le jéjunum.

Le taux d'absorption lors d'un régime équilibré étant d'environ 10 %, l'apport alimentaire quotidien doit être de 10 mg chez l'homme et de 20 mg chez la femme. Dans les pays développés, les apports sont généralement supérieurs aux besoins. Le fer héminique (viandes et poissons) est bien absorbé. Le fer non héminique (céréales, légumes secs, fruits, légumes, produits laitiers) est moins bien absorbé. C'est ainsi que le fer contenu dans le foie de veau est 20 fois mieux absorbé que celui se trouvant dans le riz. L'acide ascorbique (vitamine C) favorise l'absorption du fer non héminique alors que le thé et le café l'inhibent fortement.

Dans tous les cas l'organisme n'absorbe que la quantité de fer dont il a besoin.

Cette régulation n'est pas encore élucidée aujourd'hui. Elle comporterait deux étapes : d'abord la captation du fer de la lumière intestinale par la cellule puis son relargage par l'entérocyte vers le plasma. Un certain nombre de protéines interviendraient dans cette absorption dont la ferritine intracellulaire. Pendant son transfert dans l'entérocyte une partie du fer serait stockée sous forme de ferritine et l'importance de celle ci régulerait l'absorption du fer (c'est cette ferritine qui est perdue lors de la desquamation des entérocytes). Cependant la nature du signal permettant à la cellule muqueuse de stocker plus ou moins de ferritine n'est toujours pas élucidée.

Quoiqu'il en soit, une surcharge de l'organisme en fer diminue son absorption et au contraire, toute augmentation de l'activité érythropoïétique (saignement, hémolyse...) augmente l'absorption du fer.

1.5. Transport du fer dans le plasma

La plus grande partie du fer plasmatique est transportée par une glycoprotéine, la **transferrine,** migrant à l'électrophorèse au niveau des Pj-globulines. Cette molécule est capable de fixer **deux atomes de fer ferrique,** un à chaque extrémité de la protéine. Globalement la transferrine du plasma est saturée environ au tiers de sa capacité.

Il existe plusieurs isotransferrines plasmatiques (une vingtaine), mais cette hétérogénéité ne semble pas avoir de signification physiopathologique, car la capacité de fixation du fer de ces différentes transferrines est identique.

La synthèse de la transferrine a lieu essentiellement **dans l'hépatocyte** mais aussi un peu dans les macrophages de la moelle osseuse et de la rate. La syn-

thèse de la transferrine par l'hépatocyte est fonction de la quantité de fer dans la cellule.

Une diminution des réserves est responsable d'une augmentation de la synthèse de la transferrine et inversement dans les surcharges en fer la synthèse est diminuée.

Dans les surcharges en fer comme *l'hémochromatose,* dans laquelle il existe une trop grande absorption du métal, la transferrine est totalement saturée par le fer, et celui-ci peut être transporté par d'autres protéines comme l'albumine ou la lactoferrine.

80 % du fer transporté par la transferrine sont transférés aux érythroblastes de la moelle osseuse pour la fabrication des hématies. Les cellules érythroïdes captent le fer de la transferrine par l'intermédiaire de récepteurs appelés récepteurs de la transferrine (RTf). Toutes les cellules de l'organisme possèdent des RTf mais les érythroblastes en sont les plus richement dotés. Le nombre de RTf est le principal élément régulateur du taux de captation du fer par les érythroblastes. Ces RTf membranaires érythroblastiques, dans leur métabolisme, donnent naissance à une forme tronquée capable de passer dans le plasma où l'on peut la mesurer et que l'on appelle le récepteur soluble de la transferrine (RsTf). Il existe une bonne corrélation entre l'activité proliférative de la moelle et le taux sérique des RsTf.

Une toute petite quantité de fer du plasma normal n'est pas lié à la transferrine. Le fer y circule :

- soit lié à des petites molécules comme le citrate **ou l'acétate ;**
- soit incorpore dans la ferritine plasmatique ;
- soit fixé sur l'haptoglobine s'il est au sein de l'hémoglobine non globulaire (hémolyse) ;
- soit fixé sur l'hémopexine s'il est au sein de l'hème.

Les 3 dernières formes ne sont captées que par les hépatocytes.

1.6. Utilisation métabolique. Fer actif

L'emploi du fer radioactif a permis de montrer que 75 % du fer administré par voie veineuse sont utilisés pour **la synthèse de l'hémoglobine.**

Celle-ci utilise, pour 7g d'hémoglobine quotidiens, environ 24 **mg de fer.** La presque totalité est issue du catabolisme de l'hémoglobine dans le système réticulohistiocytaire qui libère environ 23 mg de fer. Ainsi s'expliquent les très faibles besoins journaliers, de l'ordre de 1 mg.

Les 25 % restants sont destinés à la synthèse de la myoglobine, des cytochromes, des enzymes catalases et peroxydases, molécules porteuses de ferro ou ferriporphyrines et des protéines fer-soufre des chaînes respiratoires mitochondriales.

Ce fer actif provient donc de multiples origines ; récupération du fer hémoglobinique, fer exogène alimentaire et si nécessaire fer des réserves.

1.7. Réserves en fer de l'organisme

Elles représentent à peu près 35 % du fer total sous deux formes de stockage, la ferritine et l'hémosidérine dans laquelle le fer est sous forme ferrique.

Ces deux types de réserves se trouvent surtout au niveau du foie, de la rate et de la moelle osseuse.

La ferritine représente la forme de stockage **rapidement disponible,** alors que dans l'hémosidérine le fer est plus difficilement mobilisable.

2.7.7. *Ferritine*

1.7.1.1. Ferritine tissulaire

La ferritine tissulaire est une structure ubiquitaire constituée d'une protéine, l'apoferritine, et de fer à l'état ferrique (figure 4.2).

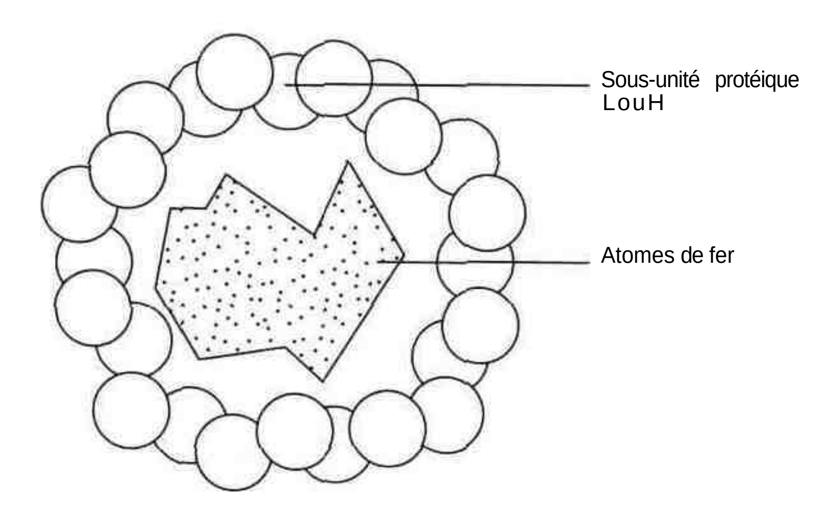


Figure 4.2 • Schéma de la molécule de ferritine.

L'apoferritine est une protéine constituée de 24 sous-unités, assemblées en une structure compacte et sphérique délimitant une cavité centrale qui peut contenir jusqu'à 4 500 atomes de fer. Cependant les ferritines tissulaires ne sont saturées en général qu'à 50 %. Les 24 unités protéiques peuvent être de deux types : L *(liver)* ou H *(heart),* et en fonction des proportions des deux sous unités un grand nombre d'apoferritines (et donc de ferritines) peuvent être retrouvées.

Bien qu'ubiquitaire, la ferritine est localisée plus particulièrement dans certaines cellules : dans les macrophages du SRH du foie, de la rate, de la moelle osseuse, et dans les hépatocytes.

Le fer des ferritines des macrophages est le premier mobilisé pour rentrer dans l'érythropoïèse, après avoir été transporté par la transferrine. Le fer des hépatocytes ne se mobilise que si la voie précédente est épuisée.

La libération du fer de la ferritine demande un système d'oxydoréduction qui est différent pour les macrophages et les hépatocytes. Dans la cellule macrophagique le fer ferrique est réduit par un système qui dépendrait de la vitamine C, ce qui lui permet de traverser la membrane. Dans l'hépatocyte, le fer ferrique serait réduit par une ferriréductase.

Le fer ferreux retrouvé dans le plasma doit être réoxydé par la *céruléoplasmine* (protéine plasmatique spécifique du transport du cuivre) pour être transporté par la transferrine.

La carence en vitamine C peut entraîner un blocage du fer dans les macrophages et donc une hyposidérémie (taux plasmatique de fer abaissé).

Un taux effondré de céruléoplasmine (maladie de Wilson) sera de même responsable d'une hyposidérémie.

1.7.1.2. Ferritine plasmatique

Une très petite quantité de ferritine (à peu près 150 µg/l soit 2,5 µmol/l) se trouve dans le plasma, où les méthodes de dosages récentes permettent de la mesurer.

Elle aurait deux origines :

- une grande partie (80 %) viendrait des macrophages du SRH où, après une synthèse spécifique (différente de la synthèse des ferritines tissulaires), elle serait sécrétée dans le plasma. *Cette ferritine est glycosylée* (une partie glucidique est fixée sur la molécule) pendant le processus sécrétoire et est *pauvre enfer ;*
- une autre partie proviendrait de la lyse des cellules de différents tissus lors de la sénescence de ceux-ci. Cette ferritine *n'est pas glycosylée et est riche enfer.*

Si quantitativement cette ferritine est mineure, elle est particulièrement importante dans le cadre de l'exploration du métabolisme du fer, car la ferritinémie est un bon reflet des réserves martiales.

7.7.2. *Hémosidérine*

Forme stable de réserve martiale elle ne libère son fer que très lentement. C'est un complexe fer-protéine qui dériverait d'une digestion lysosomiale des agrégats de ferritine. Elle se trouve, comme la ferritine, dans les macrophages du SRH et dans les hépatocytes où on peut la mettre en évidence par la coloration de Péris au bleu de Prusse.

1.8. Régulation du métabolisme cellulaire du fer

Cette régulation intervient dans l'approvisionnement de la cellule en fer mais aussi dans la protection de celle ci contre une surcharge potentiellement toxique de ce métal.

C'est le stock de fer lui même de la cellule qui régule ces deux versants du métabolisme du fer par l'intermédiaire d'une protéine cellulaire appelée IRP (ion regulatory protein). Celle ci en cas de stock cellulaire bas :

- empêche la synthèse des sous unités d'apoferritine ;
- et permet la synthèse des RTf de la cellule.

2. Exploration du métabolisme du fer

C'est un chapitre qui a beaucoup évolué ces dernières années par l'apparition de techniques permettant les dosages de la transferrine et de la ferritine plasmatiques auxquelles il faut rajouter le dosage plasmatique des RsTf.

Le fer étant un élément indispensable à l'érythropoïèse il est nécessaire, pour établir un bilan complet, de déterminer certains paramètres de la lignée rouge, au moins *le taux d'hémoglobine, l'hématocrite, et la numération des globules rouges.*

2.1. Dosage du fer sérique : sidérémie

A l'état normal ce dosage correspond à la détermination :

- du fer lié à la transferrine (pour plus de 95 %) ;
- du fer non lié à la transferrine (pour moins de 5 %) ;

A *l'état pathologique* le dosage peut inclure en plus :

- le fer hémoglobinique (hémolyse) ;
- le fer fixé sur d'autres protéines de transport que la transferrine (hémochromatose) ;
- le fer ferritinémique (nécrose cellulaire intense).

Les valeurs** habituelles de référence sont de **12 à 30 fJunol/l.

La sidérémie est sujette à des variations nycthémérales importantes avec un maximum vers midi et un minimum vers minuit. Il est donc important pour l'interprétation d'une sidérémie de standardiser le prélèvement. Il est conseillé de prélever le matin entre 8 h et 10 h.

2.2. Capacité totale de fixation de la transferrine (CTF)

Cet examen consiste à mesurer la **quantité maximale** de fer que la transferrine peut transporter. Pour cela on sature complètement la transferrine de l'échantillon par le rajout d'un excès de fer. Lorsque la tranferrine est saturée (après une certaine incubation) le fer excédentaire non fixé est retiré du milieu. Un nouveau dosage du fer de l'échantillon permet alors de connaître la CTF.

Valeurs de référence *'.de 45 à 65 µmol/l*

2.3. Capacité latente de fixation (CLF)

C'est un calcul qui permet de connaître la quantité de fer que la transferrine est capable de transporter en sus de la sidérémie. Il correspond à la différence suivante :

CLF = CTF - fer sérique

2.4. Coefficient de saturation de la transferrine (CS)

D correspond au rapport :

$$es = \frac{\text{Fersenque}}{\text{CTF}} \times 100$$

Valeurs de référence : de 25 *à 35* %

La CTF, qui est un dosage relativement peu fiable, est de plus en plus remplacée par le dosage direct de la transferrine.

2.5. Dosage de la transferrine

Des méthodes immunochimiques permettent maintenant de doser la transferrine.

L'intérêt est double :

- apprécier la capacité de synthèse du foie, en rapport avec les réserves de fer de l'organisme,
- calculer d'une façon plus correcte la capacité totale de fixation et le coefficient de saturation.

Valeurs de référence : ***de** 2 **à** 4 g/l*

La CTF et le CS se calculent facilement en sachant que le poids moléculaire de la transferrine est de 80 000 et que chaque molécule transporte 2 atomes de fer.

CTF = X g de transferrine x 25

Le calcul est le suivant :
nombre de µmoles de transferrine = $\frac{X}{80\,000} \times 10^6$

nombre de µmoles de fer = $\frac{X}{80\,000} \times 10^6 \times 2 = X \times 25$

2.6. Dosage de la ferritine plasmatique : ferritinémie

Les valeurs de référence sont difficiles à indiquer car variables d'une méthode à l'autre. De plus la ferritinémie doit être interprétée en fonction de l'âge et du sexe. L'homme présente une ferritinémie plus élevée que la femme et chez celle ci les taux moyens de 30 µg/l augmentent après la ménopause aux environs de 80 |JLg/l.

En moyenne on peut donner les valeurs de référence suivantes :

Homme : **50 à 350 µg/l**
Femme : **30 à 120** |JLg/l

2.6.1. Hypoferritinémie

C'est actuellement le **meilleur marqueur des carences martiales.**

En cas de manque de fer l'hypoferritinémie est le signe le plus précoce, bien avant l'hyposidérémie ou le retentissement érythropoïétique. C'est aussi un signe particulièrement sensible car *il n'existe pas d'autre pathologie induisant une hypoferritinémie.*

Sous l'influence d'une thérapeutique substitutive, la ferritine plasmatique est le dernier signe à revenir à la normale. Son dosage est donc nécessaire au contrôle ultime de la restauration des réserves.

2.6.2. *Hyper ferritinémie*

Si une surcharge en fer, comme dans l'hémochromatose, augmente la ferritinémie, une augmentation de la ferritine plasmatique peut aussi se voir en dehors de toute augmentation du fer de l'organisme. C'est le cas :

- au cours des inflammations car la ferritine est une protéine de la réaction inflammatoire. L'hyperferritinémie ici est due à l'augmentation de la sécrétion par les macrophages du SRH. Cette hyperferritinémie contraste avec une hyposidérémie due à une rétention du fer dans le SRH ;
- au cours de l'alcoolisme chronique ou l'hyperferritinémie est due l'action directe de l'alcool sur la synthèse de cette protéine associée au retentissement hépatique et à une surcharge en fer du foie. L'alcool a de plus un retentissement

sur certaines formes circulantes de la transferrine. On a remarqué que les isoformes les moins sialylées de cette glycoprotéine (c'est-à-dire les moins riches en glucides) se retrouvaient avec un pourcentage plus important chez l'alcoolique chronique. Ce dosage appelé « transferrine désialylée » (ou — CDT — *carbohydrate déficient transferrin)* est un nouveau test qui vient s'ajouter à la batterie des tests de dépistage de l'alcoolisme chronique ;

- au cours des cytolyses hépatiques (hépatites) ;
- au cours de certaines néoplasies (cancer du sein, des poumons, des ovaires, leucémies) dans lesquelles l'hyperferritinénùe serait due à une sécrétion anormale de ferritine par les cellules tumorales.

2.7. Dosage des récepteurs solubles de la transferrine (RsTf)

Le récepteur membranaire de la transferrine (RTf) porté par presque toutes les cellules peut subir une protéolyse donnant naissance à des formes tronquées qui passent dans le plasma. Ces structures plasmatiques, appelées récepteurs solubles de la transferrine, peuvent être dosées par des techniques immunoanalytiques.

Les RTf sont présents sur toutes les cellules de l'organisme à l'exception des érythrocytes, cependant ce sont les érythroblastes qui en sont les plus richement dotés. Ce récepteur capte la transferrine transportant le fer et permet son internalisation cellulaire. Le nombre de RTf membranaires est régulé par la concentration intracellulaire en fer. Les RsTf correspondent aux RTf ayant perdu leur domaine cytoplasmique et transmembranaire. La source principale des RsTf étant représentée par les RTf des cellules érythroïdes on peut constater qu'il existe une bonne corrélation entre l'activité proliférative de la moelle et la concentration sérique des RsTf.

2.8. Les études ferrocinétiques

Elles consistent à injecter par voie intra-veineuse du ^{59}Fe radioactif lié à la transferrine, et à mesurer les cinétiques de sa disparition plasmatique et de son incorporation dans l'hémoglobine des GR circulants.

Ce test apporte des informations sur l'efficacité et le siège de l'érythropoïèse.

3. Variations pathologiques

Ce chapitre traditionnellement décomposé en « hyposidéremie et hypersidérémie » doit être revisé en fonction des connaissances récentes du métabolisme du fer, et plutôt être traité en carences martiales et surcharges en ce même métal.

3.1. Carences martiales

C'est un phénomène fréquent qui touche plusieurs centaines de millions d'êtres humains dans le monde. En cas de pertes supérieures aux entrées, l'organisme puise sur ses réserves et une carence s'installe.

Elles relèvent sous nos climats, davantage d'une perte excessive que d'un manque d'apport.

3.1.1. Etiologies

3.1.1.1. Saignements chroniques

Chez l'homme et la femme ménopausée on doit rechercher en priorité une perte digestive.

Chez la femme en période d'activité génitale on recherchera d'abord une perte génitale.

3.1.1.2. Utilisation intensive du fer

- Chez une femme au cours du dernier trimestre de la grossesse ou ayant présenté des grossesses répétées. 70 % de ces femmes présentent, s'il n'y a pas de supplémentation, un état carentiel.
- Au cours de la première année de la vie pendant que les réserves sont faibles et l'alimentation lactée pauvre en fer.
- Don du sang régulier. Des dons répétés (supérieurs à trois par an) **peuvent** petit à petit épuiser les réserves d'un organisme.
- Hémodialysés. Certains insuffisants rénaux peuvent développer une carence martiale (pertes au moment des dialyses, examens biologiques fréquents...)

3.1.2. Biologie

La carence s'installe progressivement et passe par trois phases : (voir tableau 4.2)

- carence latente ;
- carence installée ;
- anémie.

Le terme ultime de la carence est en effet *une anémie microcytaire hypo-**chrome.***

Anémie : Diminution de la quantité d'hémoglobine circulante.

Valeurs de référence :

- Homme de 13 à 18 g/100 ml
- Femme et enfant de 12 à 16 g/100 ml
- Nouveau-né de 14 à 20 g/100 **ml.**

Microcytaire :

Les GR ont un volume globulaire moyen (VGM) inférieur à la normale.

Valeurs de référence : 85 < VGM < 95 μm^3

$$\text{Calcul du VGM :} \frac{\text{Hématocrite}}{\text{nombre de GR}}$$

Hypochrome :
La teneur globulaire moyenne en Hb (TGMH) est inférieure à la normale.
Valeurs de référence : 27 < TGMH < 33 pg

$$\text{Calcul du TGMH :} \frac{\text{Hb (g/mm}^3)}{\text{nombre de GR}}$$

Il est très important de dépister une carence martiale avant son terme, qui est l'anémie.

À chaque stade de l'évolution de la carence correspondent des signes biologiques particuliers. Ils sont regroupés dans le tableau 4.2.

Tableau 4.2 • Évolution biologique au cours de la carence martiale.

	Carence latente	Carence installée	Anémie
Ferritine	Abaissée	Très abaissée	Très abaissée
Transferrine ou CTF	N	Augmentée	Augmentée
es	N	Abaissé	Très abaissé
Fer sérique	N	N	Abaissé
Hémoglobine	N	N	Abaissée
Microcytose	N	N	Oui
Hypochromie	N	N	Oui

N = Normal

3.1.3. Cas particulier des « anémies inflammatoires »

Fréquemment chez des sujets présentant un syndrome infectieux sévère, un syndrome inflammatoire ou une néoplasie, une anémie se développe.

Celle-ci est au début normochrome normocytaire mais évolue bientôt vers une *anémie hypochrome microcytaire* faisant intervenir une carence martiale.

La physiopathologie de ce manque de fer mettrait en cause une protéine des polynucléaires neutrophiles, la lactoférrine. La dégranulation des polynucléaires au cours de ces pathologies libère la lactoférrine *qui, présentant une très grande affinité pour le fer, déplace celui-ci de la transferrine.* La lactoférrine saturée en

fer est ensuite piégée par les macrophages du SRH où le fer s'accumule sous forme de réserves. *La moelle osseuse est donc privée du fer qui lui est normalement apporté par la transferrine.*

Dans ces syndromes il n'y a pas de carence martiale vraie, mais un stockage du fer dans le SRH et un manque d'apport à la moelle osseuse.

Ceci explique la **biologie** (tableau 4.3), dans laquelle la ferritine n'est plus le marqueur de dépistage de la carence martiale. Celle ci, comme toute protéine inflammatoire, est en effet augmentée. Le fer sérique est abaissé car piégé par les macrophages et dans ces conditions la transferrine a tendance à baisser. Comme le fer et la transferrine baissent tous les deux, le CS peut rester normal. Il est abaissé si le fer baisse proportionnellement plus que la transferrine. Les RsTf sont normaux puisqu'il n'y a pas de surcharge martiale.

Si au cours de ces syndromes inflammatoires ou infectieux survient une carence en fer, notamment chez le vieillard, le diagnostic devient difficile à établir. La ferritine (tableau 4.3) n'est d'aucun secours (normale ou augmentée) et le taux de transferrine peut être très variable. Dans ces conditions le dosage des RsTf trouve ici sa principale indication. En effet sa concentration est indépendante de l'inflammation ou de l'infection alors qu'elle augmente en cas de carence martiale.

Tableau 4.3 • Biologie des anémies inflammatoires (N = normal).

'	Anémie inflammatoire et carence en fer	Anémie inflammatoire
Ferritine	Augmentée	Augmentée ou N
Transferrine	Abaissée en général	Variable
Fer sérique	Abaissé	Abaissé
es	N ou Abaissé	Variable
RsTf	Normaux	Abaissés

3.2. Surcharges en fer

II convient de distinguer l'hémochromatose génétique des surcharges tissulaires secondaires.

\2.1. Hémochromatose génétique

'est une *maladie héréditaire* transmise sur le mode récessif.

"e traduit par une *surcharge enfer due à une augmentation de l'absorp-*

"wle sans lien avec les besoins de l'organisme.

Le fer va s'accumuler tout au long de la vie dans de nombreux tissus, notamment le foie, entraînant un tableau clinique et biologique particulier.

3.2.1.1. Clinique

Le tableau clinique complet, exceptionnellement observé dans nos régions, associe :

- un dépôt de fer dans la peau entraînant une *mélanodermie* (aspect bronzé de la peau), et sur les muqueuses, en particulier dans la bouche ;
- une hépatomégalie (augmentation du volume du foie) qui peut être très importante. L'évolution se fait vers la cirrhose par sidéronécrose d'où le nom donné à cette maladie de « *cirrhose bronzée* » ;
- des troubles du métabolisme des glucides avec *diabète* (atteinte du pancréas et du foie) ;
- des signes endocriniens dominés par une *insuffisance gonadique* d'origine hypophysaire ;
- des manifestations cardiaques avec des troubles du rythme et parfois une insuffisance cardiaque ;
- des manifestations osseuses et articulaires (déminéralisation, ostéophytose...).

3.2.7.2. *Biologie*

Le fer s'accumule d'abord beaucoup plus dans le foie que dans les macrophages du SRH ce qui permet d'expliquer le tableau biologique :

- le fer sérique est très augmenté ;
- le CS *de la transferrine* est très élevé ;
- la *transferrine* est diminuée ;
- la *ferritine plasmatique* n'est augmentée que dans les stades évolués de la maladie, et dans le cadre d'enquêtes familiales de dépistage elle n'est d'aucune utilité, les macrophages n'étant pas encore envahis.

Ces malades relèvent d'une thérapeutique qui consiste à effectuer des saignées fréquentes qui éliminent du fer, en surveillant la ferritine qui doit rester basse.

3.2.1.3. Génétique

Depuis le milieu de l'année 1996 le clinicien dispose d'un test génétique direct permettant, à partir d'un prélèvement sanguin, d'établir le diagnostic d'hémochromatose génétique. Il consiste en la recherche de la mutation C282Y portée par le gène HFE situé sur le chromosome 6 (remplacement de la cystéine 282 par une tyrosine). Si C282Y est retrouvé à l'état homozygote, le diagnostic d'hémochromatose génétique est porté. Si C282Y est retrouvé à l'état hétérozygote, le diagnostic d'hémochromatose est retenu mais toute surcharge impor-

tante et évolutive devra faire éliminer une autre cause de surcharge martiale. Si C282Y n'est pas retrouvé, on peut raisonnablement éliminer, en l'état actuel des connaissances, une hémochromatose génétique.

3.2.2. Surcharges secondaires enfer

Ces surcharges peuvent être secondaires à certaines anémies, à une insuffisance rénale, à une maladie métabolique, à une maladie hépatique.

3.2.2.1. Surcharges des anémies

Elles peuvent entraîner une surcharge en fer par deux mécanismes :
- des *transfusions* qui tentent de corriger l'anémie ;
- un *avortement de la maturation des GR et leur destruction précoce* (hémolyse) qui sont responsables d'une érythropoïèse accrue mais inefficace, laquelle entraîne une augmentation de l'absorption du fer.

Rentrent dans ce cadre les anémies dues :
- à une *hémoglobinopathie* dans laquelle il y a synthèse d'une hémoglobine anormale, par le remplacement d'un acide aminé par un autre sur une des chaînes de globine ;
- à une *thalassémie* dans laquelle un type de chaîne de la globine n'est pas synthétisé (le plus souvent la chaîne (3 —> (3-thalassémie) ;
- à une impossibilité primitive d'incorporation du fer dans le GR.

Les dépôts affectent surtout la moelle osseuse où l'on retrouve des érythroblastes chargés en granules de fer colorables par la coloration de Péris appelés *sidéroblastes.*

La surcharge en fer peut évoluer vers une véritable hémochromatose si une thérapeutique efficace n'est pas instituée. Celle-ci fait appel à un chélateur du fer, la desferrioxamine (Desféral®) qui mobilise le fer des réserves et permet son élimination urinaire et fécale.

Tout ceci explique la **biologie** de ces maladies dans lesquelles on a :
- une anémie hypochrome ;
- un fer sanguin qui est souvent normal mais parfois augmenté ;
- une ferritine circulante augmentée.

3.2.2.2. *Surcharge secondaire des insuffisants rénaux*

Les insuffisants rénaux peuvent développer des carences en fer, mais le plus souvent par le fait de transfusions répétées ou par supplémentation à titre systématique lors des hémodialyses, ils vont présenter une surcharge en fer.

3.2.2.3. Surcharge secondaire à une maladie métabolique

- *Syndrome d'hépatosidérose dysmétabolique* qui associe à un contexte polymétabolique (surpoids et /ou troubles du métabolisme des glucides et / ou des

lipides et /ou hypertension artérielle) une hyperferritinémie avec des taux de transferrine et de fer normaux. Le foie présente une stéatose mais la physiopathologie de ce syndrome est inconnue. Il est cependant rencontré assez fréquemment.

- *Porphyrie cutanée*
- *Atransferrinémie* dans laquelle l'organisme ne synthétise pas de transferrine. Le fer absorbé fuit immédiatement vers les réserves (maladie exceptionnelle).

3.2.2.4. Surcharge secondaire à une maladie hépatique

D est habituel de classer certaines hépatopathies, en particulier alcooliques, dans les surcharges secondaires.

Il est en effet retrouvé, par cytolyse hépatique, une augmentation du fer circulant et de la ferritinémie. Cependant des études récentes ont montré que le fer global de l'organisme n'était pas augmenté et que l'on ne pouvait pas parler dans ce cas de surcharge vraie.

4. Techniques de dosage

4.1. Fer plasmatique (ou sérique)

Ce qui est dosé, c'est le fer presque exclusivement transporté par la transferrine.

L'heure de la ponction veineuse doit être standardisée du fait de la variation nycthémérale : on préconise entre 8 h et 10 h du matin.

Les techniques physiques telles que l'absorption atomique ou la coulométrie ont une diffusion restreinte (1,5 % des laboratoires français).

Le fer est surtout déterminé par *colorimétrie.* Le principe de dosage est le suivant :

$$Fe^{+++} \text{ lié à la transferrine } \xrightarrow[\text{pH} < 5]{\text{acidification}} Fe^{+++} + \text{apotransferrine}$$

$$Fe^{+++} \xrightarrow{\text{réducteur}} Fe^{++}$$

$$Fe^{++} + \text{chromogène} \longrightarrow \text{produit coloré}$$

Deux grands types de méthodes coexistent :

- celles dans lesquelles les protéines sont précipitées, **mais du fait de l'automation**, ces techniques disparaissent du marché ;
- celles dans lesquelles on conserve les protéines en suspension et qui sont appelées « directes ».

Ces techniques directes connaissent un très grand succès en raison du développement des automates.

L'adjonction de *chlorhydrate de guanidine* permet de maintenir les protéines en solution malgré le pH acide.

Tous les chromogènes peuvent être utilisés : BPS (Bathophénanthroline sulfbnée, férène S, TPTZ (tripyridyltriazine), ferrozine, mais ceux qui ont une sensibilité élevée (férène S et ferrozine) sont maintenant les plus diffusés, car à concentration en fer égale, le produit coloré mesuré présente une absorbance plus élevée.

4.2. Transferrine

Son taux peut être évalué indirectement en saturant la transferrine par un excès de fer, suivi par un dosage de la sidérémie après élimination du fer en excès (non fixé) par sa récupération sur de l'hydroxycarbonate de magnésium ou sur une résine échangeuse d'ions. C'est une technique qui ne donne pas de bons résultats.

Le dosage direct de la transferrine, technique qui doit être préférée, se fait par une technique immunochimique qui peut être automatisée.

4.3. Ferritine plasmatique

Le dosage de la ferritine plasmatique ou sérique, est maintenant accessible à tous les laboratoires par l'apparition d'automates appliquant une technique immuno-enzymologique avec marqueur non isotopique. Cependant certains laboratoires hospitaliers continuent de doser cette molécule par une technique radio-immunologique faisant appel à des marqueurs radioactifs.

Références bibliographiques

Commission « Fer et protéines de transport » (SFBC) : *Modification de la technique sélectionnée pour la détermination du fer dans le sérum,* ISB 1991, 4, 247-256.

Fer et ferritine ; exploration et intérêt médical. Option/Bio n° 1, 1992.

P. Métais et al. *Biochimie clinique.* **Tome 1,** Tome 3, Simep, Villeurbanne, 1988.

M. Paris et al. *Métabolisme du fer. Exploration biologique actuelle.* Le concours médical 1991, 113,29-34.

J.C. Renversez *et al. La transferrine déficiente en acide statique : un marqueur biologique prometteur, sensible de l'éthylisme chronique.* Ann Biol Clin 1992, 50,1-7.

M. Vemet. *Ferritine. Aspects techniques, place de cet examen dans l'exploration du métabolisme du fer et dans diverses pathologies.* Feuillets de biologie 1989, 166, 35-42.

Biologie et génétique des anomalies du métabolisme du fer. Ann Biol Clin, vol.56 n° spécial, juillet 1998

M. Vemet. *Le récepteur de la transferrine : rôle dans le métabolisme du fer et intérêt en biologie clinique.* Ann Biol Clin 1999, 57,9-17.

5

Métabolisme du magnésium, du cuivre et du lithium

Pierre Valdiguié et Thierry Levade

Sous-chapitre 1 : MAGNÉSIUM

Le magnésium est un métal blanc argenté, s'oxydant facilement à l'air (d'où son important pouvoir réducteur) qui joue un rôle important en biologie humaine, aussi bien sur le plan dynamique, comme cofacteur de nombreuses réactions enzymatiques, que sur le plan statique car il participe, avec le calcium, à la structure de l'os.

1. Notions physiologiques et biochimiques fondamentales

1.1. Répartition

Un adulte de 70 kg contient en moyenne 1 000 mmol soit 2 000 mEq de magnésium soit environ 24 g (le magnésium étant un cation bivalent de poids atomique 24,31).

Plus de 50 % de ce total sont constitués par le **magnésium osseux** qui se présente sous forme de carbonate amorphe fixé à la surface des cristaux d'hydroxy-apatite. Il ne peut, cependant, en aucun cas remplacer le calcium au sein de ces

cristaux. D contribue à compenser rapidement les variations de la magnésiémie, remarquablement stable.

Dans le sang, le magnésium plasmatique n'atteint pas 1 % du capital global. Dans les tissus mous, le magnésium est surtout abondant dans le muscle où il participe à la constitution des chaînes d'actomyosine.

1.2. Origine du magnésium

Les besoins quotidiens alimentaires sont chez l'adulte de 0,25 à 0,5 g et chez le nourrisson de l'ordre de 6 mg/kg de poids corporel.

Les principales sources alimentaires sont le lait et les végétaux verts (chlorophylle).

Son absorption intestinale (qui a principalement lieu au niveau du jéjunum et de l'iléon) dépend de conditions et de facteurs très proches de ceux qui règlent l'absorption calcique. Elle est en effet favorisée par un régime riche en protéines, l'acidité gastrique, la sécrétion de parathormone, la vitamine D et est diminuée par un régime riche en acides gras, en phosphates et en phytates.

Plus de la moitié du magnésium ingéré est rejetée dans les fèces chez l'adulte.

13. Métabolisme et action biochimique

Dans le sérum, le magnésium se présente, comme le calcium, sous deux formes :

- **diffusible,** comprenant le *magnésium ionisé* (55 %) (au niveau du rein, on admet l'existence d'une filtration glomérulaire portant sur la fraction ionisée puis d'une réabsorption tubulaire portant sur 90 % du magnésium filtré), et le *magnésium complexé* lié à des anions comme les phosphates, citrate ou lactate (10 à 15%),
- **non diffusible** correspondant au *magnésium lié aux protéines* (30 à 35 %).

*Cofacteur de nombreuses **enzymes*** du métabolisme intermédiaire, le magnésium est surtout un cation intracellulaire (principalement localisé dans les mitochondries). Sa détermination dans les érythrocytes sera ainsi un moyen indirect de l'apprécier.

Il intervient également dans ***les phénomènes d'excitabilité neuromusculaire*** en synergie avec les ions H$^{1''}$ et Ça$^{1''1''}$ (globalement l'ion Mg^{++} étant un ion « sédatif »). Il joue probablement un rôle dans les ***phénomènes d'agrégation plaquettaire*** et est antagoniste de certains effets du calcium.

2. *Exploration*

2.1. Méthodes de dosages

Le dosage du magnésium n'est réellement satisfaisant qu'en ***spectrophotométrie d'absorption atomique*** (méthode de référence) ; cependant seulement 3,2 % des laboratoires utilisaient cette technique en avril 1989.

Les méthodes colorimétriques sont les plus utilisées avec pour indicateur colore la calmagite (77,9 %) ou le magon (11,4 %). Ainsi, en milieu alcalin la calmagite bleue forme avec le magnésium un complexe rosé dont l'intensité de coloration, lue à 538 nm, est proportionnelle à la concentration du magnésium.

L'EGTA (ethylène glycol tétra-acétique) et le cyanure de potassium éliminent les interférences du calcium et des métaux.

2.2. Valeurs usuelles

Les valeurs usuelles sont :

- ***dans le sérum*** ***0,65 à 1,15 mmol/l (1,3 à 2,3 mEq/l) ;***
- ***dans les érythrocytes*** ***1,65 à 3,20 mmol/l ;***
- ***dans les urines*** ***1 à 12 mmol/24 h.***

La concentration intra-érythrocytaire en magnésium exige l'absence d'hémolyse pour un dosage sérique exact.

La détermination du *magnésium intra-érythrocytaire* est intéressante à effectuer, les érythrocytes étant les cellules permettant d'approcher la teneur en magnésium des autres cellules de l'organisme. Cependant, il faut savoir que la teneur intra-érythrocytaire est 2,5 à 3 fois plus faible que celle des autres cellules.

Une augmentation physiologique de la magnésiémie peut être observée chez le nourrisson et la femme enceinte.

3. *Variations pathologiques*

3.1. Hypermagnésiémies

L'hypermagnésiémie (au dessus de 2,5 mmol/l) entraîne d'abord :

- *des troubles cardiaques* liés à l'allongement des temps de conduction sinoauriculaire et intracardiaque ;
- *des troubles respiratoires ;*
- *des troubles nerveux* avec somnolence et coma (narcose magnésienne) au delà de 7,5 mmol/l.

***Les principales causes d'hypermagnésiémie* sont :**

- *l'insuffisance rénale* au cours de laquelle elle évite le plus souvent une tétanie (pour une clairance de la créatinine inférieure à 0,5 ml/s, le magnésium peut atteindre 1,5 mmol/1). L'hypermagnésiémie est habituellement lente ;
- *l'intoxication iatrogène* à la suite d'injections de sérum glucose magnésie hypertonique intraveineux pour le traitement de l'éclampsie.

3.2. Hypomagnésiémies

3.2.1. Spasmophilie

L'hypomagnésiémie (au dessous de 0,7 mmol/1), associée ou non à une hypocalcémie, peut entraîner des mouvements anormaux, prédominant aux membres supérieurs, une tétanie vraie, une spasmophilie.

La spasmophilie ou tétanie normocalcémique ou tétanie chronique idiopathique est un syndrome clinique très fréquent — ou tout au moins très fréquemment diagnostiqué. Problème de médecine praticienne plus que d'hôpital, elle se manifeste par des signes très variables selon les individus (souvent de sexe féminin) :

3.2.1.1. Signes

- Parfois une ***tétanie classique,*** sensitivomotrice avec son spasme carpopédal, la main d'accoucheur, les troubles centripètes de la sensibilité et jamais de perte de connaissance.
- Le plus souvent ce ne seront que des ***signes fonctionnels*** regroupés habituellement sous le terme de « dystonie neurovégétative » et participant à une névrose anxieuse : hyperémotivité, paresthésies laryngées, dyspnée « sine materie », sensation d'oppression thoracique, palpitations, céphalées, dysphagie, atonie vésiculaire avec ballonnement post-prandial, éructations, colopathie spasmodique avec alternance de diarrhée et constipation, lombalgies et dorsalgies, etc.
- Il y a cependant dans tous les cas une ***hyperexcitabilité neuromusculaire*** objectivée par le ***signe de Chvostek positif*** (attraction de la commissure labiale lors de la percussion à mi-chemin entre le conduit auditif externe et l'angle buccal) et ***une activité répétitive à l'électromyographie*** (doublets, triplets, multiplets).
- ***La baisse du magnésium sérique*** est rare, un peu moins lors du ***dosage érythrocytaire*** et se pose alors le problème de savoir si la spasmophilie est une entité définissable. On parle alors de « terrain spasmophile » **ou d'«** activité autorythmique » survenant chez un sujet normal à l'occasion d'un stimulus adéquat, tel que l'hyperpnée ou l'émotion...

3.2.1.2. Traitement

- ***Symptomatique :*** ne pouvant traiter toutes les plaintes du malade, seules seront prises en compte celles qui constituent une gêne à l'activité professionnelle ou aux relations socio-familiales.
- ***Le traitement médicamenteux*** associera aux anxiolytiques le magnésium, en cure longue, parfois du 25-OH-cholécalciférol.

3.2.1.3. Etiologies

Les principales causes sont :

- *en pathologie digestive*, maldigestion, malabsorption intestinales, les pertes digestives lors de fistules ou de diarrhées au long cours ;
- *en pathologie rénale,* toutes les causes entraînant une diminution de la réabsorption tubulaire ;
- *les pertes cutanées **importantes*** **(brûlures) ;**
- *l'allaitement prolongé.*

3.2.2. Autres origines

- **Hypomagnésiémie du nouveau-né.**

Elle peut s'observer :

- Au cours de l'alimentation au lait de vache, qui, riche en phosphates, peut inhiber l'absorption intestinale.
- A la naissance, avec un caractère familial idiopathique.

3.3. Variations urinaires

Une **hypermagnésiurie** peut être notée, à l'occasion d'une hypomagnésiémie, quelle qu'en soit sa cause.

Une **hypomagnésiurie** peut enfin s'observer en cas de dénutrition profonde voire de malabsorption sévère, où d'autres signes prédomineront.

Sous-chapitre 2 :
CUIVRE

Oligoélément de poids atomique 63,55, le cuivre est indispensable à la vie car il fait partie intégrante de la structure de diverses oxydases. Il appartient au groupe des « éléments trace » car sa quantité totale chez un adulte de 65 kg n'est que de 100 mg.

1. Métabolisme

1.1. Besoins

Ils sont de l'ordre de 2 à 3 mg/j chez l'adulte, de 4 à 7 mg/j chez le jeune.

1.2. Apports, absorption

Les céréales, le lait, les viandes (40 à 50 mg de cuivre/jour pour une ration protidique normale) représentent les apports les plus importants et largement excédentaires.

L'absorption est intestinale après ionisation par **l'acide chlorhydrique** gastrique. Ses modalités exactes ne sont pas connues.

Ceci amène à parler de la « biodisponibilité » du cuivre, c'est-à-dire la proportion de l'apport alimentaire qui, après absorption effective, sera capable d'assurer son rôle biologique.

1.3. Transport sanguin

Dans le sang le cuivre est présent dans les globules rouges (sous forme d'érythrocupréine) et dans le plasma il est soit libre (< 5 %) ou fixé sur la sérum-albumine (2 %), soit **surtout présent dans une α_2-glycoprotéine, la céruléoplasmine (95** %).

C'est une hétéroprotéine, de couleur bleue, contenant 6 à 8 atomes de cuivre selon les auteurs, pour un poids moléculaire de 135 000 d soit 0,34 % de cuivre. La nature de la liaison cuivre-protéine n'est pas totalement connue. Elle peut perdre in vitro la moitié de son cuivre **sous** l'action d'un réducteur comme l'acide ascorbique.

La céruléoplasmine possède l'activité d'une **oxydase** où le cuivre serait le coenzyme. C'est une protéine de la reaction inflammatoire. (Cf. chapitre 9).

Chez l'adulte les *valeurs usuelles de céruléoplasmine sont de 0,2 à 0,5 g/l.*

1.4. Répartition dans l'organisme

En dehors du cuivre globulaire et plasmatique, de nombreux tissus sont riches en cuivre (foie, muscles).

Cependant **le système nerveux central** vient indiscutablement en tête. La teneur en cuivre de la substance grise est beaucoup plus élevée que celle de la substance blanche. Le locus niger a une charge cuprique particulièrement importante. Une cuproprotéine a été isolée du cerveau et dénommée cérébrocupréine.

1.5. Élimination

Le cuivre normalement ne s'accumule pas dans l'organisme.

Les voies d'élimination sont de valeur très inégale :

- une part mineure (du fait de la faible part du cuivre diffùsible) est éliminée par *voie urinaire :* environ 20 (xg/j,
- une majeure partie est éliminée par *les voies biliaires et par les fèces :* le cuivre fécal représente plus de 99 % du cuivre alimentaire.

Son origine est double :

- cuivre ayant simplement traversé le tube digestif sans être absorbé,
- cuivre absorbé dans l'intestin et ensuite partiellement éliminé par la bile et les autres sécrétions digestives.

1.6. Rôle métabolique

Le cuivre fait partie, comme cofacteur, de divers systèmes enzymatiques impliqués dans des **réactions d'oxydoréduction** ou dans **le métabolisme de l'oxygène**.

Ce métal n'agit jamais comme ion libre, mais

- soit sous forme liée par valence à la partie protéique de métalloenzymes,
- soit sous forme de complexe non saturé pouvant se lier au substrat.

Les principales enzymes renfermant du cuivre sont la *dopamine (S-hydroxylase,* catalysant la synthèse de la noradrénaline, la *cytochrome C oxydase,* maillon des chaînes respiratoires, la *céruléoplasmine* (impliquée dans le transport du cuivre et surtout dans une activité ferro-oxydasique maintenant le fer à l'état ferrique) et la *superoxyde dismutase* qui protège les cellules de l'effet toxique des radicaux libres de l'oxygène.

2. *Exploration*

2.1. Prélèvement et techniques

Pour le *prélèvement sanguin et le recueil des urines,* il est conseillé d'utiliser du matériel plastique pour éviter les phénomènes d'absorption qui ont lieu sur le verre.

Le dosage s'effectue :

- soit selon une technique de spectrométrie d'absorption atomique utilisant une flamme air acétylène à la longueur d'onde de 324,8 nm ;
- soit par des techniques colorimétriques (bathocuproïne, oxalyidihydrazide) moins sensibles et moins spécifiques.

2.2. Valeurs usuelles

La cuprémie ou cuivre plasmatique est de ***12 à** 25 **µmol/l.***

Pendant l'évolution de la grossesse, la cuprémie augmente régulièrement jusqu'au terme, parallèlement à l'augmentation de la céruléoplasmine, liée aux œstrogènes.

Les traitements aux œstrogènes et les contraceptifs oraux produisent le même effet.

Les valeurs urinaires usuelles sont **< 1,5 p.mol/24 h.**

3. *Variations pathologiques*

• **Les carences en cuivre avec hypocuprémie s'observent :**

- soit dans le cas d'une maladie héréditaire très rare, liée au chromosome X : la maladie de Menkès, caractérisée par un défaut d'absorption intestinale du cuivre, de diagnostic précoce très difficile et de pronostic le plus souvent fatal avant 3 ans.
- soit chez le nouveau-né soumis à une alimentation parentérale exclusive.
- soit dans des affections très diverses : syndrome néphrotique (par fuite de céruléoplasmine), syndromes de malabsorption (sprue et maladie cœliaque) ou d'hypercatabolisme (brûlures étendues), et enfin dans les sévères dénutritions (kwashiorkor et marasme).

• **Les hypercuprémies** peuvent se rencontrer dans une foule d'affections : hémochromatose, cirrhose biliaire primitive, hémopathies malignes, maladies du collagène et enfin dans tous les états inflammatoires où il y a élévation de la céruléoplasmine.

• **La maladie de Wilson** est une maladie héréditaire rare, de transmission autosomique récessive. Le gène a été identifié sur le chromosome 13 ; il code une ATPase membranaire transporteuse de cation. Cette affection est caractérisée par une accumulation progressive de cuivre dans l'organisme et principalement dans le foie, le système nerveux central et la cornée. La symptomatologie associe une cirrhose hépatique, une dégénérescence des noyaux gris centraux (dégénérescence hépatolenticulaire), une atteinte rénale et un anneau vert péricornéen (anneau de Kayser-Fleischer).

Les signes biochimiques sont un abaissement du cuivre et de la céruléoplasmine plasmatiques, une élévation de l'élimination urinaire du cuivre et de sa concentration hépatique.

Le traitement consiste en l'administration de la D-pénicillamine.

Sous-chapitre 3 :
LITHIUM

Le lithium est un métal alcalin, comme le sodium ou le potassium, qui n'est normalement pas présent dans le plasma, sauf à l'état de traces, et il n'a d'ailleurs pas de rôle physiologique connu.

Il est utilisé en thérapeutique dans les **psychoses maniaco-dépressives** (troubles de l'humeur avec alternance de périodes d'excitation maniaque ou hypomaniaque et des périodes de dépression plus ou moins profonde). En médecine générale, diverses autres indications ont aussi été proposées car il n'exerce aux doses thérapeutiques aucun effet dépresseur sur le système nerveux central.

La toxicité des sels de lithium, carbonate ou gluconate, commercialisés sous les noms respectivement de Téralithe® et Neurolithium® risque cependant d'entraîner une pathologie iatrogène sérieuse et le rôle du laboratoire est important pour maintenir les concentrations plasmatiques aux valeurs correctes, justifiant ce chapitre particulier.

1. Métabolisme

Le lithium est habituellement prescrit par voie buccale. Après cette **administration orale,** le carbonate ou le gluconate de lithium est absorbé totalement et

rapidement dans le tube digestif. L'absorption est associée à celle du sodium et retentit donc aussi sur l'absorption de l'eau et de diverses substances dissoutes, comme le glucose. Ainsi s'expliqueront la diarrhée et les vomissements lors des intoxications lithiées.

Il diffuse ensuite dans tous les secteurs **liquidiens** (diffusion égale à celle de l'eau totale) mais la pénétration cellulaire est beaucoup plus lente, ce qui explique le délai d'environ une semaine avant l'obtention d'une réponse thérapeutique correcte.

On observe d'ailleurs une **répartition très variable** suivant les organes et le temps total de transfert intracellulaire est faible dans le foie mais élevé dans le cerveau (où certaines cellules sont capables d'accumuler ce métal). Le lithium est aussi présent dans la salive et dans le lait.

La pénétration intracellulaire se fait probablement par plusieurs mécanismes :

- *transport par les bicarbonates*, qui serait le mécanisme le plus important ;
- *diffusion passive* sans doute en même temps que le sodium.

En revanche *l'expulsion du lithium par le mécanisme de la pompe à sodium* se fait beaucoup plus difficilement que pour le sodium, ce qui explique sans doute la rapidité de survenue des signes d'intoxication au niveau du rein, du cerveau et du cœur.

La demi-vie plasmatique est comprise entre 18 et 36 heures ; elle semble augmenter chez les patients soumis à une lithiothérapie au long cours.

Le mécanisme d'action du lithium est encore mal connu.

Au niveau de l'extrémité des fibres adrénergiques du cerveau, une augmentation du « turnover » de la noradrénaline a été signalée, liée peut-être à un effet stimulant sur la dopamine (3-hydroxylase, enzyme de la synthèse des catécholamines noradrénaline et adrénaline.

L'élimination rénale du lithium se fait par filtration complète au niveau du glomérule puis réabsorption presque complète (environ 75 %) au niveau du tubule proximal suivie d'une excrétion distale peu modifiée par l'aldostérone ou les diurétiques classiques.

Cette excrétion rénale est liée au sodium car les deux ions Na^+ et Li^+ ont des mécanismes de transport certainement identiques. Ainsi s'explique la rétention lithiée plasmatique rapide des régimes sans sel.

Toute élévation du taux plasmatique perturbe aussi l'élimination de l'eau et des ions H^+, avec diabète insipide résistant à l'hormone antidiurétique.

2. *Exploration*

Le sang pour dosage du lithium sérique sera prélevé sur un tube sec ; par contre le lithium érythrocytaire sera prélevé sur tube contenant de l'EDTA.

Le prélèvement est effectué avant une nouvelle prise et toujours à la même heure.

Le lithium est dosé par spectrophotométrie d'émission de flamme, en utilisant du chlorure de potassium ou de césium comme standard interne, à la longueur d'onde de 670 nm. Depuis peu des appareils équipés d'électrode sélective à lithium sont apparus, et permettent de doser cet élément avec une bonne fiabilité.

La zone thérapeutique est :

- *pour le sérum* de 0,6 à 1 mmol/1
- *pour les érythrocytes* de 0,2 à 0,4 mmol/1.

La conduite du traitement, après contrôle de l'intégrité rénale, nécessite une surveillance régulière du taux de lithium plasmatique afin d'adapter la posologie par une augmentation progressive des doses. La posologie sera, bien entendu, adaptée à chaque individu et à la réponse clinique.

La lithiémie efficace une fois atteinte, les dosages de contrôle seront d'abord hebdomadaires puis ensuite mensuels.

Les seules **contre-indications** majeures tiennent :

- à l'insuffisance rénale en raison de l'élimination du métal par le néphron ;
- à la prescription d'un régime désodé pour asystolie, hypertension artérielle ou tout autre syndrome rénal ou cardiovasculaire ;
- à la présence d'un traitement diurétique agissant sur la déplétion sodée ;
- à la grossesse (premier trimestre) et à l'allaitement.

Les signes d'intoxication lithiée sont liés aux concentrations plasmatiques du lithium :

- au dessus du seuil de 1,2 mmol/1, les premiers signes à apparaître sont *digestifs,* avec diarrhée, vomissements, suivis ensuite par des *troubles neurologiques,* avec troubles du comportement par confusion mentale, tremblements, obnubilation puis coma.

Cette intoxication aiguë devra être traitée par des perfusions de bicarbonate de sodium. Il est exceptionnel, hormis les cas d'intoxication volontaire, que l'on soit amené à utiliser l'épuration extra-rénale par hémodialyse ;

- l'intoxication chronique s'installe progressivement avec des *troubles du rythme cardiaque,* hypotension mais surtout risque de *diabète insipide.*

En pratique courante les doses initiales doivent être faibles, habituellement 2 à 3 comprimés répartis dans la journée. Elles seront augmentées progressivement jusqu'à obtenir la dose thérapeutique efficace.

Références bibliographiques

S. Bernard. *Biochimie clinique,* Maloine, Paris, 1985.

B. Flechet. *Guide des Analyses Spécialisées,* 1990, Laboratoires CERBA. Dans la Banque Télématique de la Société Française de Biologie Clinique.

0. Houot, P. Tarallo. *Le cuivre. In P. Chappuis. Les oligoéléments en médecine et biologie,* p. 459, **Lavoisier Tec et Doc,** Paris,1991.

C. Muguet. *Guide des analyses spécialisées.* 1990 Laboratoire CERBA.

G. Richet et al. *Equilibre hydro-électrolytique normal et pathologique,* J.B. Baillière, Paris, 1979.

G. Ulrich. *Guide des analyses spécialisées* 1990, Laboratoire CERBA. Dans la banque télématique de la SFBC.

6

Métabolisme des glucides

Pierre Valdiguié et Thierry Levade

Par l'importance des glucides dans la ration alimentaire et dans le métabolisme énergétique de la cellule, par la fréquence très grande du diabète sucré, on comprend l'intérêt toujours soutenu de l'étude de la physiologie et de la biochimie du métabolisme glucidique, des moyens d'exploration dynamique de la glyco-régulation, visant essentiellement à dépister le diabète au stade infraclinique.

Si les traitements du diabète patent et de certaines de ses complications sont bien connus, par contre nous n'avons encore que des renseignements incomplets sur la physiopathologie et la génétique des diabètes non insuline-dépendants.

1. Notions physiologiques et biochimiques fondamentales

1.1. Glycémie

C'est une des constantes biologiques fondamentales située entre ***4,45 et*** *5,55* ***mmol/l*** (0,8 et 1 g/1, PM = 180) soit 5 ***mmol/l*** en moyenne. De son maintien dépendent en particulier le fonctionnement cérébral dangereusement atteint au dessous de 1,65 mmol/l et certains troubles hydroélectrolytiques (coma hyperosmolaire) lors de fortes hyperglycémies.

7.7.7. *Origine du glucose sanguin*

Le glucose sanguin, mélange d'à et (3-glucopyranoses provient de deux sources :

1.1.1.1. Origine exogène

L'alimentation humaine comporte un apport en glucides qui représente environ 50 % de la ration énergétique, soit un ***apport moyen de 200 à 300 g/jour.***

Les glucides alimentaires sont de *source principalement végétale*. Les apports sont complétés par les laitages et les sucres raffinés (annexe 1).

Une partie des glucides est apportée sous forme simple, fructose contenu dans les fruits, galactose du lait. Cependant la plupart des sucres simples sont représentés par les diosides tels le saccharose et le lactose.

Une autre partie des glucides, en particulier ceux contenus dans les pommes de terre, les féculents, est apportée *sous forme de polyosides* (amidon). Ils devront être hydrolyses avant d'être absorbés dans l'intestin.

En effet seuls le glucose, le galactose, le fructose, le sorbitol peuvent franchir la barrière intestinale et passer dans la circulation sanguine.

La digestion salivaire permet, sous l'action de l'amylase, d'hydrolyser les longues chaînes d'amidon en oligosides et diosides. Elle se poursuit sous l'action de l'amylase pancréatique

La digestion intestinale est l'étape définitive. Elle a lieu tout au long du grêle. Elle permet d'obtenir des oses à partir des oligosides et des diosides. Une fois hydrolyses en sucres simples, les glucides sont absorbés, grâce à un phénomène actif, par la muqueuse intestinale et déversés dans la circulation porte. L'absorption des sucres nécessite l'intégrité de la muqueuse intestinale. Elle est aussi liée à la température, au pH du milieu et à la présence conjointe d'autres produits absorbables (acides gras, peptides, acides aminés).

1.1.1.2. Origine endogène

• A *partir des glucides*

- Le glycogène représente la forme de réserve glucidique de toute cellule animale. Chez l'homme, le foie est l'organe dont la teneur en glycogène peut être la plus élevée (10 à 12 % du poids frais) mais les muscles (1 à 3 % du poids frais) renferment grâce à leur masse, la moitié du glycogène total de l'organisme.

On appelle glycogénolyse le processus par lequel le glycogène est décomposé dans la cellule : ou bien cette dégradation se poursuit par le catabolisme de radicaux glucose (glycolyse) ou bien le glucose est libéré et s'échappe de la cellule pour passer dans la circulation sanguine. Le premier cas intéresse tous les tissus, le second est limité au foie, mais son importance physiologique est très grande dans la régulation de la glycémie (transformation du glycogène en glucose sous l'action d'une enzyme débranchante, d'une phosphorylase, dont l'activation est catalysée par l'adrénaline et le glucagon puis l'AMPc, donnant le glucose-1-phosphate, d'une phosphoglucomutase formant du glucose-6-phosphate lequel subira l'action de la glucose-6-phosphatase pour donner finalement du glucose libre).

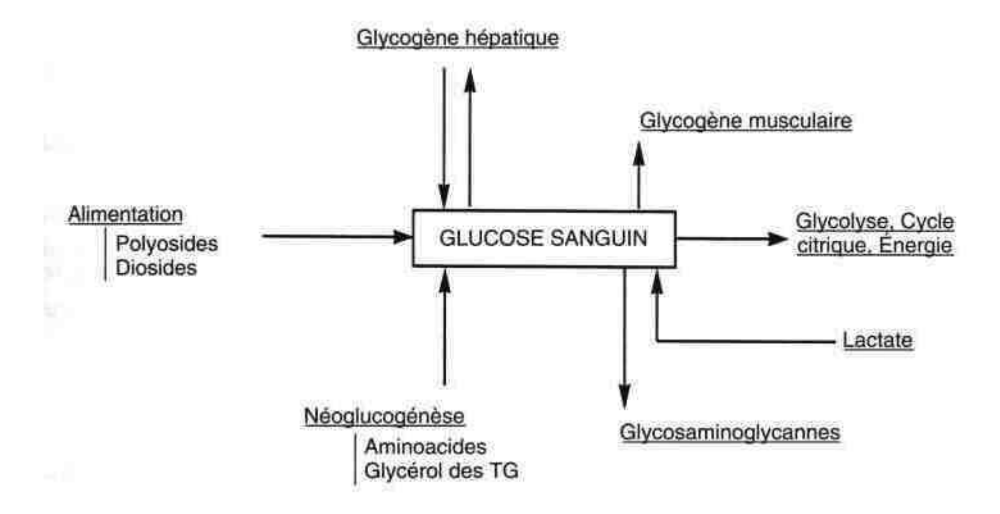


Figure 6.1 • Origine et destinées du glucose sanguin.

- **A partir des autres hexoses,** le glucose est normalement le précurseur des autres oses de l'organisme même si ceux-ci sont apportés par l'alimentation, il est exceptionnel qu'ils soient utilisés comme tels et ils sont généralement transformés en glucose au niveau du foie.

• A *partir des lipides et des protides — Néoglycogénèse ou Néoglucogénèse*

- En principe, la cellule animale trouve suffisamment de glucose dans son alimentation pour ne pas avoir besoin d'en synthétiser. Mais plusieurs circonstances peuvent l'y contraindre : le jeûne glucidique, un catabolisme protéique excessif ou plus simplement le travail musculaire générateur d'un excès d'acide lactique que la cellule hépatique utilise pour la régénération du glycogène.

Les composés glucoformateurs autres que l'acide pyruvique et l'acide lactique sont essentiellement les protides par **les acides aminés glucoformateurs** dont le catabolisme aboutit à l'acide oxaloacétique ou à l'acide pyruvique. Leur catabolisme excessif (jeûne, diabète, action des hormones corticostéroïdes hyperglycémiantes) aboutit à une formation de glucose et de glycogène. De même l'acide a-cétoglutarique issu de la transamination est un excellent précurseur du glucose.

- Les lipides peuvent, par le **glycérol,** donner du glucose. La transformation des acides gras et de l'acétate en glucose, n'est pas une voie classique.

Le foie assure à lui seul 90 % de la néoglucogénèse dans l'organisme (le rein intervenant pour 10 %). La néoglucogénèse peut fournir jusqu'à 300 g de glucose par jour.

1.1.2. *Facteurs de régulation de la glycémie*

1.1.2.1. *Facteur physico-chimique d'autorégulation*

Toutes les réactions chimiques entraînant la disparition du glucose :

Pyruvate <——> Glucose <——> Glycogène

sont en équilibre et la loi d'action de masse régira ces équilibres, orientant le sens des réactions pour les dévier du corps le plus concentré vers le moins concentré.

1.1.2.2. Facteur métabolique

- *L'utilisation du glucose* entraîne rapidement une hypoglycémie (que le glucose provienne du glycogène ou du glucose circulant, la cellule ne l'utilise que sous forme de glucose-6-phosphate).

- Pour fournir de l'énergie, après oxydation, la principale voie glycolytique est celle d'Embden Meyerhof caractérisée par la formation d'un ester diphosphorique du fructose. La glycolyse aboutit à la formation d'acide pyruvique qui constitue un aliment préférentiel pour la mitochondrie.

La dégradation complète du glucose comporte donc deux séries de réactions : la première, catalysée par les enzymes solubles du cytoplasme, est réalisée **en** anaérobiose ; la seconde, au niveau des mitochondries, est strictement aérobie.

En anaérobiose, l'acide pyruvique conduit à l'acide lactique, phénomène prédominant dans la contraction musculaire.

En aérobiose, l'acide pyruvique est l'objet d'une décarboxylation oxydative par les mitochondries avec formation d'acétyl-CoA ; ainsi deux carbones de l'acide pyruvique sont incorpores dans une molécule d'acide citrique qui pourra suivre alors la voie du cycle tricarboxylique de Krebs. Le bilan de ce cycle est l'oxydation complète du radical acétyle en gaz carbonique avec production de 12 ATP.

- Pour fournir du NADPH+H"[1]", la deuxième voie glycolytique est une voie oxydative appelée voie des pentoses car elle donne naissance à plusieurs pentoses. Le principal intérêt de cette voie oxydative directe du glucose-6-phosphate réside en ce qu'elle est génératrice de NADPH+H"[1]", coenzyme spécifique de plusieurs réactions importantes :

- Synthèse de l'acide phosphoénoipyruvique qui, après carboxylation, pourra contribuer au cycle citrique en lui fournissant l'acide oxalo-acétique.
- Biogénèse des acides gras,
- Biogénèse des stérols, hydroxylations diverses.

- Pour fournir de l'acide glycuronique, après oxydation (lors des processus de détoxication).

- *Le stockage sous forme de glycogène* est aussi une autre forme de maintien, bien classique, de la glycémie.

La glycogénogénèse à partir du glucose et la glycogénolyse apparaissent comme un double processus équilibré, mais pas strictement réversible.

La réaction catabolique s'effectue plus facilement que la réaction de synthèse dans le milieu aqueux où vivent nos cellules.

L'existence de deux voies catalysées par des enzymes différentes permet de comprendre la régulation endocrinienne du métabolisme du glycogène, dont la dégradation est activée par l'adrénaline et la synthèse par l'insuline.

Ainsi finalement, chez un sujet en équilibre pondéral où l'activité physique est mineure :

- 67 % des glucides alimentaires sont dégradés, `

, **- 3 % enrichissent les réserves glycogéniques,**

; > **- 30 % sont stockés sous forme de réserves adipeuses.**

1.1.2.3. Facteur nerveux.

Les centres hypothalamiques commandent l'appétit **et la satiété, la** production d'hormones hypophysaires.

Le système orthosympathique et les médullo-surrénales enfin interviennent par les catécholamines (le stress et l'hypersympathicotonie inhibent la sécrétion d'insuline induite par le glucose).

Par opposition à l'action du système parasympathique dont la stimulation provoque une insulino-sécrétion, *le système nerveux sympathique* est directement impliqué dans la régulation de l'équilibre glycémique puisque tous ses effets sont hyperglycémiants. Ceci a une importance très grande chez le diabétique insuline-dépendant chez lequel les émotions peuvent provoquer selon le cas hyper ou hypoglycémie.

1.1.2.4. Facteur hormonal

II est tout à fait fondamental, grâce à :

- Un système hyperglycémiant associant de multiples hormones.

Les hormones de l'urgence ont pour rôle de mobiliser dans un temps très court le glucose dont l'organisme a un besoin urgent. Elles agissent donc essentiellement sur le foie et sur les muscles, mais leur action est évidemment ubiquitaire ;

- les catécholamines (adrénaline et **noradrénaline)** *favorisent :*

- la glycogénolyse hépatique par un double mécanisme, (3 adrénergique AMPc dépendant (activant une protéine kinase qui elle même active les phosphorylases) et a adrénergique Ça"*"*" dépendant ;

- la glycogénolyse musculaire sous l'effet d'un mécanisme p adrénergique ; elle s'accompagne d'une lipolyse importante ;

- la sécrétion de glucagon ;

inhibent l'insulinosécrétion par un effet adrénergique.

- **Le glucagon** (sécrété par les cellules a des îlots de Langerhans) :
- provoque une glycogénolyse franche et massive par activation du système des phosphorylases ;
- active la néoglucogénèse et la lipolyse ;
- active puissamment la sécrétion insulinique.

- **Les hormones d'action hyperglycémiante progressive** interviennent pour maintenir le niveau normal de la glycémie.

La somathormone ou hormone de croissance, alors qu'à faible dose elle stimule la sécrétion d'insuline, est au contraire « diabétogène » à des taux plus importants. Elle freine l'action glucokinasique. Elle freine la lipogénèse.

Le *cortisol* (le nom même de glucocorticoïde montre bien l'action de l'hormone), a une action néoglucogénétique. Il active la lipolyse et la protéolyse et stimule la néoglucogénèse à partir des aminoacides.

- *Un système hypoglycémiant unique, opposé à la multiplicité des systèmes hyperglycémiants est représenté par l'insuline.*

1.1. Métabolisme et action biochimique de l'insuline

Dès le XIXe siècle, la notion de pancréas endocrine apparaît, puis celle de la production par cette partie de la glande, d'une substance contrôlant le métabolisme des glucides.

Le XXe siècle voit apporter la preuve par Banting et Best (1922), de l'existence de cette substance tandis que Sanger établit sa composition en acides aminés et que Steiner découvre son précurseur la pro-insuline (1967).

1.2.1. Métabolisme

1.2.1.1. Structure (annexe 2)

Polypeptide de PM 5800, l'insuline est constituée de deux chaînes : *la chaîne* A (21 acides aminés) et *la chaîne B* (30 acides aminés) réunies par deux ponts disulfures qui relient les cystéines 7 et 20 de la chaîne A avec respectivement les cystéines 7 et 19 de la chaîne B.

La pro-insuline est composée des deux chaînes A et B de la molécule d'insuline et d'un troisième polypeptide, de connexion, *le peptide C* (33 acides aminés, PM environ 3 000), qui relie l'extrémité N terminale de la chaîne A à l'extrémité C terminale de la chaîne B.

La différence de structure primaire des diverses insulines de mammifères ne porte le plus souvent que sur trois acides aminés.

La configuration moléculaire (structure quaternaire) de l'insuline est celle d'un hexamère formé par trois dimères assemblés autour d'un axe reliant trois atomes de zinc.

La molécule d'insuline est antigénique mais son activité immunologique dépend plus de la structure polymérique, quaternaire, que de la structure primaire, c'est-à-dire la séquence des aminoacides.

1.2.1.2. Synthèse et stockage

La cellule (3 des îlots de Langerhans du pancréas fabrique en premier la **pré-proinsuline.** Cette protéine, qui représente le produit de transcription du gène de l'insuline, est constituée de proinsuline, allongée à l'extrémité aminée de la chaîne B par une séquence « signal » de PM 2500.

Après élimination de cette chaîne, le produit obtenu est la **proinsuline** qui s'accumule dans le réticulum endoplasmique où l'établissement des ponts disulfures lui donne sa structure définitive.

La vitesse de cette étape est rapide, de l'ordre d'une minute. La proinsuline est ensuite transportée dans *l'appareil de Golgi* où commence sa conversion en insuline, qui se poursuivra dans *les granules de stockage.* Cette étape de conversion aboutit à la formation **d'insuline** et de **peptide C.**

Le zinc contenu dans la cellule β favorise la formation des hexamères d'insuline.

Alors que la proinsuline n'est pratiquement pas sécrétée, insuline et peptide C par contre sont sécrétés en quantité égale.

1.2.1.3. Sécrétion

Les 1 000 à 5 000 cellules (3 de chaque îlot de Langerhans fonctionnent comme des détecteurs métaboliques.

La sécrétion est provoquée, **physiologiquement** par :

- *l'élévation de la glycémie* (le glucose étant le stimulant fondamental),
- *certains acides aminés (leucine, arginine),*
- *certains ions :*

- L'élévation du taux du K^+ *extracellulaire* ou le blocage des canaux K^+ déclenche la dépolarisation de la membrane et la stimulation de l'insulino-sécrétion.

- L'afflux intra-cellulaire du calcium ionisé est donc indispensable pour que se manifeste la réponse insulinique à un stimulus glucose.

- *Les hormones gastro-duodénales* (l'action insulino-sécrétrice du glucose est plus marquée après ingestion qu'après injection intraveineuse).

Au point de vue pharmacologique, enfin, sont insulino-stimulateurs : les *sulfamides hypo-glycémiants,* le *glucagon* ; sont insuline-inhibiteurs les *catécholamines.*

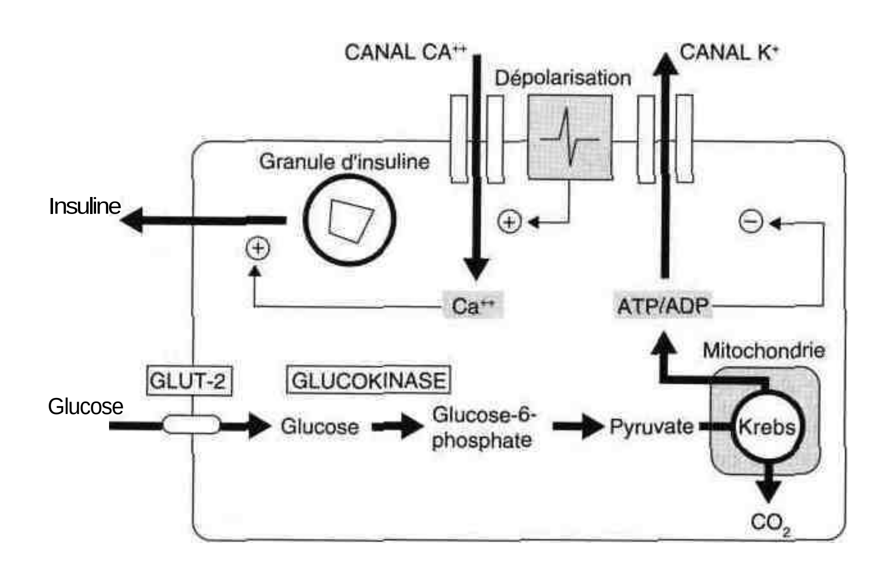


Figure 6.2 • Mécanismes de sécrétion de l'insuline (d'après Heuquin).

1.2.1.4. Circulation — Distribution — Dégradation

Une fois sécrétée et libérée, l'insuline circule de façon libre, non liée de façon significative aux protéines plasmatiques.

Sa demi-vie biologique est d'environ 10 minutes, l'espace de diffusion est

* celui du secteur extracellulaire.

L'essentiel de la dégradation de l'insuline (90 %) se fait au niveau du foie, le reste étant dégradé au niveau du rein.

1.2.2. Action biochimique

1.2.2.1. *Récepteurs membranaires de l'insuline*

La première étape de l'action de l'insuline sur les organes cibles se produit par fixation de l'insuline sur des **récepteurs spécifiques membranaires.** Leur affinité pour l'insuline est spécifique ; il existe un seuil d'action et un effet de saturation des sites (coopérativité négative).

Les récepteurs sont des glycoprotéines membranaires appartenant au groupe des récepteurs « tyrosine kinase ». Ils sont constitués de deux sous-unités a et deux sous-unités (3. Le nombre de récepteurs varie avec la structure cellulaire considérée et les conditions physiologiques et pathologiques. L'affinité pour l'insuline est telle qu'elle ne nécessite pas la saturation de l'ensemble des récepteurs pour une activité maximale.

L'insuline se fixe à la sous-unité a, la sous-unité (3 change alors de conforma-

tion, ce qui active une *tyrosine kinase* qui phosphoryle l'unité (3 et d'autres tyrosines intracellulaires.

L'activation persiste même si l'insuline se détache du récepteur.

L'insuline agit par l'intermédiaire de l'AMPc, du GMPc, du Ça ionisé, des réactions de phosphorylation et de déphosphorylation des protéines, des peptides messagers. Il est d'un intérêt majeur de savoir s'il existe un messager cellulaire commun, capable d'expliquer les actions post-récepteurs de l'insuline.

Les actions cellulaires de l'insuline dépendent des cellules sur lesquelles elle agit.

La régulation du nombre de récepteurs est sous la dépendance de l'insulinémie.

On peut concevoir deux types de *pathologie des récepteurs de l'insuline :*

- une diminution du nombre absolu des récepteurs ;
- une anomalie de leur fonctionnement expliquant, par exemple, une diminution de l'activité biologique malgré une hyperinsulinémie.

1.2.2.2. Rôle de l'insuline

» Sur le métabolisme glucidique

- *Au niveau du foie*

La phosphorylation du glucose en glucose-6-phosphate, sous l'action de la glucokinase et/ou de l'hexokinase est contrôlée par l'insuline qui active aussi l'enzyme clef de la glycolyse, la phosphofructokinase responsable de la phosphorylation du fructose-6-phosphate en fructose 1-6 diphosphate.

Elle favorise la glycogénèse en activant la glycogène synthétase et en inhibant en retour la glycogène phosphorylase.

Elle inhibe fortement la néoglycogénèse (effet anti-cortisol).

Au total l'insuline favorise l'utilisation du glucose par le foie et son stockage sous forme de glycogène.

- *Au niveau du tissu adipeux :*

Elle augmente la captation et le métabolisme du **glucose par** l'adipocyte. Elle a un effet antilipolytique.

- *Au niveau du muscle :*

Elle active le captage du glucose par la cellule et le métabolisme du glycogène.

• Sur le métabolisme lipidique

- *Au niveau des lipides plasmatiques*

Ils sont épurés grâce à l'action de la lipoprotéine Upase dont la synthèse tissulaire nécessite la présence d'insuline.

- *Au niveau du tissu adipeux*

L'insuline stimule la lipogénèse et inhibe la lipolyse.

- *Au niveau du foie,* l'action est grossièrement comparable à celle du tissu adipeux.

- ***Sur le métabolisme protidique***

Elle diminue le taux des acides aminés circulants en augmentant la captation cellulaire des acides aminés, en augmentant la synthèse protéique (par stimulation de l'activation des aminoacides et de la lecture ribosomiale des ARN messagers), en diminuant la protéolyse.

2. *Exploration de la glycorégulation*

Du plus simple au plus complexe, trois moyens principaux sont à décrire :
- dépister la glycosurie ;
- doser la glycémie ;
- pratiquer des épreuves complémentaires.

Ces examens sont complétés par d'autres tests utilisés dans le cadre du typage du diabète, de sa surveillance et de ses complications.

2.1. Glycosurie

2.7.7. *Dépistage*

Elle est recherchée en mettant en évidence **le pouvoir réducteur de l'urine** sur la liqueur de Fehiing ou de Benedict, ou sur des comprimés réactifs renfermant les mêmes constituants que cette dernière (Clinitest®).

Ces réactions mettent en évidence la présence de corps réducteurs et *ne sont pas spécifiques du glucose.* C'est dire l'intérêt de la réaction enzymatique.

Sous l'influence de **la glucose oxydase,** le glucose est oxydé en acide gluconique avec formation d'eau oxygénée. En présence de peroxydase, l'eau oxygénée produite transforme un chromogène en un composé colore.

Ces réactifs imprègnent *une bandelette de papier filtre* qu'il suffit de tremper dans l'urine en surveillant au bout de quelques secondes l'apparition de la coloration de l'extrémité de la bande.

La comparaison avec une échelle colorimétrique permet un *dépistage semi-quantitatif.*

Cette méthode très sensible est parfois faussée positivement par des oxydants comme les hypochlorites, eau de javel, soluté de Dakin, négativement par des réducteurs : acide ascorbique.

Les contaminants bactériens peuvent consommer le glucose éventuellement présent dans l'urine, entraînant par là des résultats sous-évalués ou même faussement négatifs.

Le dosage de la glycosurie met en jeu les mêmes techniques et nécessite les mêmes précautions que le dosage de la glycémie.

2.1.2. Mécanisme

II est exclusivement rénal. Normalement pour des taux glycémiques allant jusqu'à 9,44 et **10,00 mmol/1, la réabsorption tubulaire proximale est complète.** En cas de seuil bas, la glycosurie peut apparaître pour des valeurs beaucoup plus basses de glycémie (grossesse, diabète rénal). En cas de seuil rénal élevé, la glycémie peut dépasser 11 mmol/1, sans qu'il n'existe de glycosurie (sujet âgé, insuffisance rénale).

Au-delà du seuil, la cellule tubulaire accroît sa capacité de reabsorption mais celle-ci n'est plus complète et la glycosurie apparaît.

Pour des glycémies très élevées de l'ordre de 22 mmol/1, la cellule tubulaire est complètement saturée et la glycosurie est alors proportionnelle à la glycémie.

Ceci permet de mesurer le pouvoir de saturation de la réabsorption tubulaire ou tolérance maximum du glucose ou taux maximum de réabsorption du glucose (TMG) qui est d'environ 1,94 mmol/minute.

Le taux de la glycosurie, chez un sujet diabétique, sera donc éminemment variable suivant les taux de la glycémie dans la journée.

La surveillance de la glycosurie est encore l'unique auto-contrôle exercé par de nombreux diabétiques. La surveillance de la glycosurie ne comporte qu'un seul avantage : elle est effectivement plus facile que l'auto-contrôle glycémique.

Cependant ses inconvénients sont très importants : elle ne reflète qu'imparfaitement les glycémies, elle est constamment « en retard » sur le chiffre actuel de la glycémie puisque l'urine a stagné dans la vessie d'où la nécessité de faire l'examen sur des urines fraîches, de 2e jet.

Cependant, l'appréciation de la glycosurie reste très utile, lorsque le diabétique a des glycémies stables, pour contrôler l'absence de glycosurie nocturne et... pour reposer son doigt des piqûres multiples.

12. Glycémie

f

: Glycémie et glycosurie sont des urgences techniques : tout milieu biologique contient toujours assez d'enzymes glycolytiques pour dégrader le glucose présent et engendrer rapidement une erreur par défaut : **la conservation de l'échantillon prélevé en l'absence d'agent inhibiteur de la glycolyse ne doit pas dépasser une heure.**

La glycémie peut être dosée **aussi bien sur sang total héparine que sur sérum.** La glycémie est identique de part et d'autre de la membrane érythrocytaire : un certain degré d'hémolyse ne gêne pas. Le contenu d'un tube capillaire héparine suffit largement, récolté à la pulpe du doigt après coupure par vaccino-

style (idéal pour les glycémies itératives des hyper et hypoglycémies provoquées) ou au talon pour le nourrisson.

Lorsque l'échantillon doit attendre plus d'une heure, entre le prélèvement et l'analyse, le sang doit être recueilli sur un **inhibiteur de la glycolyse** (fluorure de sodium qui est un antiglycolytique par formation d'un complexe fluorophosphomagnésien éliminant du milieu le magnésium indispensable à l'action de l'énolase). Ce prélèvement conserve son glucose intact pendant six heures. Cependant l'échantillon est hémolyse et la présence du fluorure de sodium empêche tout autre type de dosage sur ce prélèvement.

Le prélèvement doit être effectué chez un sujet **strictement à jeun depuis 10 heures.** La principale cause d'erreur par excès à côté de l'absence de cette précaution est la classique perfusion intra-veineuse de sérum glucose, erreur très fréquente en milieu hospitalier.

2.2.1. *Méthodes de dosage*

Les méthodes enzymatiques représentent 99 % des techniques utilisées. 80 % utilisent la glucose oxydase, 7 % l'hexokinase.

Parmi les principes méthodologiques les plus utilisés, nous citerons celui utilisant le réactif de Trinder et une technique mettant en jeu une électrode.

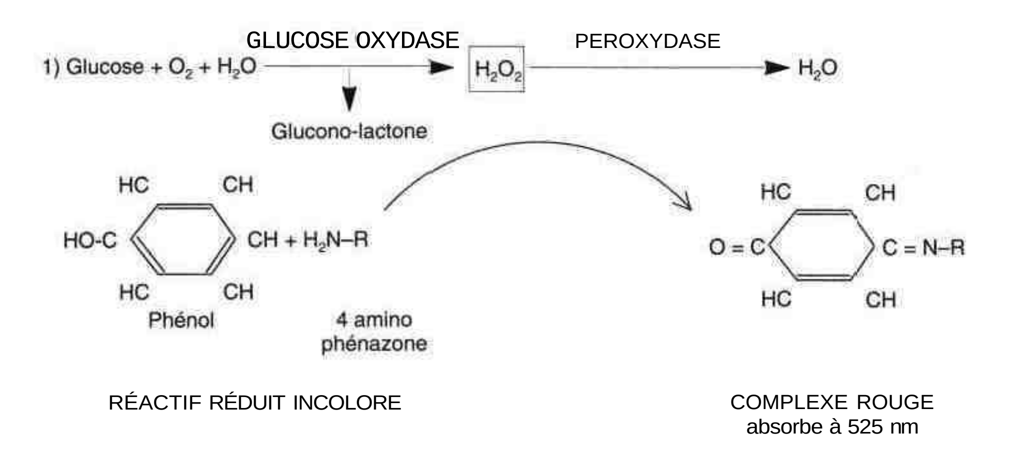


Figure 6.3 • Schéma reactionnel par la méthode de Trinder.

À l'aide d'un spectrophotomètre, l'intensité de la réaction colorée (absorbance) est mesurée à 525 nm.

Cette méthode peut aussi être réalisée à l'aide de **bandelettes réactives** (ressemblant à celles utilisées pour les urines) dont l'extrémité, imprégnée de réactifs, reçoit une goutte de sang. La variation de coloration est appréciée soit visi-

blement à l'aide d'une échelle colorée soit par un lecteur portable indépendant et elle permet d'estimer la valeur de la glycémie.

Le prélèvement au bout du doigt permet donc de réaliser facilement cet « autocontrôle glycémique » si important maintenant pour l'équilibrage de la glycémie des diabétiques, en particulier ceux porteurs d'une pompe à insuline, implantée ou non.

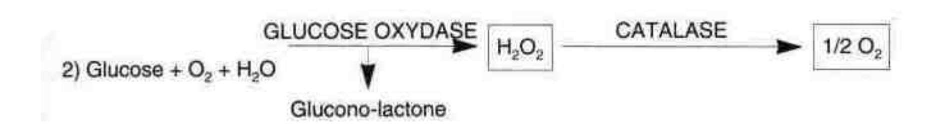


Figure 6.4 • Schéma réactionnel avec mesure de la production d'oxygène.

La vitesse d'apparition de l'oxygène est mesurée par polarographie à l'aide d'une électrode sélective.

D'autres méthodes mettent en jeu des réactifs à base de cqenzymes nicotiniques comme indicateurs.

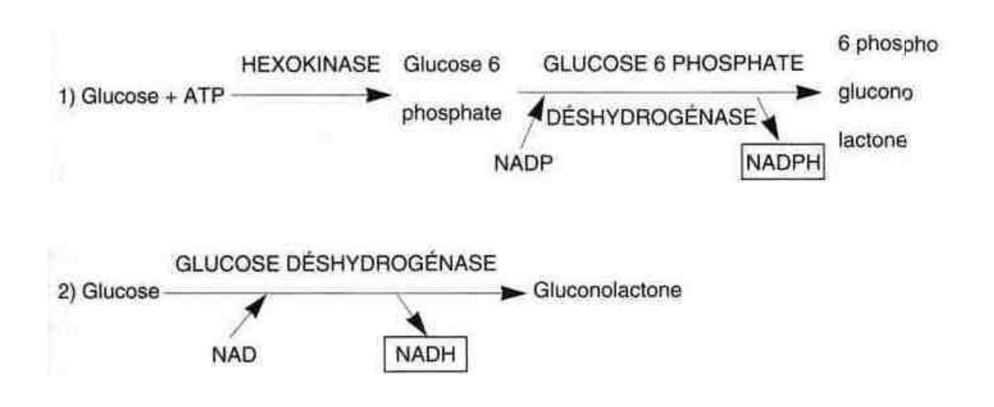


Figure 6.5 • Schéma réactionnel avec lecture à 340 nm.

On suit dans les deux cas à 340 nm, la cinétique d'apparition du coenzyme nicotinique réduit.

2.2.2. *Valeurs usuelles*

La zone de normalité est comprise entre :

- ***3,9 et** 5,8 **mmol/l*** (soit 0,7 à 1,05 g/1) de 10 à 60 ans
- *-20%* de 1 mois à 4 ans

- -5 à -10 % de 4 à 10 ans
- + 10 % après 60 ans.

Le glucose veineux, du fait de l'utilisation périphérique, est légèrement inférieur à celui du sang artériel. Chez le nourrisson, le prélèvement doit être fait au maximum 2 heures après le biberon.

Les émotions, le froid provoquent une légère hyperglycémie d'origine adrénalinique.

La prise d'alcool avant le prélèvement peut entraîner une augmentation de la glycémie de 20 à 50 %, la prise de cigarette de 10 %.

2.3. Épreuves dynamiques et dosages complémentaires

Ces épreuves dynamiques d'exploration et certains dosages (insuline, acides gras non estérifiés) sont destinés à mettre en évidence des troubles du métabolisme glucidique non ou mal décelés par les méthodes précédentes d'exploration statique.

2.3.1. Épreuves d'hyperglycémie provoquée

Le principe de cette épreuve a été déduit de la constatation de l'hyperglycémie alimentaire. En effet, après chaque repas, de petites flèches hyperglycémiques surviennent, qui, à l'état normal, ne dépassent jamais 8,30 mmol/1 (1,50 g/1).

2.3.1.1. Hyperglycémie provoquée par voie orale (HGPO)

Cette épreuve, qui est la plus classique, permet d'apprécier la tolérance glucidique en suivant les variations de la glycémie après une charge en glucose administrée per os.

- *Protocole :* on administre **une quantité de glucose standard de** 75 g dans un minimum d'eau (au plus 250 ml), le sujet étant à jeun depuis 12 heures avec une alimentation équilibrée (200 à 300 g de glucides) dans les trois jours qui précédent l'épreuve. Proscrire (si possible) les corticoïdes, les diurétiques thiazidiques, les catécholamines, les œstroprogestatifs qui diminuent la tolérance au glucose.

Les glycémies sont dosées avant l'absorption, puis de demi-heure en demi-heure pendant 3 ou 4 heures.

La glycosurie est recherchée et dosée s'il y a lieu après 1 heure et 2 heures.

- *Normalement la glycémie augmente et atteint son maximum entre 30 et 60 minutes* (il est donc quasi impossible de la matérialiser par les prélèvements). Cette variation doit être **inférieure à 2,8 mmol/1** (0,5 g/1) puis elle redescend à son niveau initial **en un temps inférieur à 2 heures.** Après le retour à la normale survient une onde d'hypoglycémie, liée à l'insulinosécrétion (baisse de 0,8 mmol environ pendant 20 à 40 minutes).

La glycosurie doit être nulle.

Depuis 1980, l'on a proposé des critères très larges, mais unanimement admis, afin de permettre, dans la quasi totalité des cas, d'interpréter les glycémies des différentes situations (tableau 6.1).

Remarque : pour un enfant, la dose prescrite sera fonction du poids, (1,75 g par kg) sans dépasser 75 g.

- *L'interprétation est souvent difficile :* courbe anormalement *élevée* dans l'obésité, les hépatites, les pancréatites sans qu'il s'agisse véritablement de diabète ; courbe plate dans les troubles de l'absorption intestinale.

De plus, *la notion d'âge* intervient puisque la tolérance au glucose diminue progressivement avec l'âge, en dehors de toute affection chronique (pour interpréter au dessus de 50 ans, il faut classiquement ajouter 0,5 mmol/1 par glycémie).

Cette épreuve quoique parfois insuffisante, n'en représente pas moins l'épreuve de base de l'exploration fonctionnelle de la glycorégulation. Toute anomalie même minime suffit pour justifier d'autres investigations.

Tableau 6.1 • Nouveaux critères de diagnostic du diabète sucré.
D'après, Diabètes Care 1997, 20, 1183-97 ; Ann. Biol. Clin., 1999, 57, 427-435.

• Symptômes cliniques de diabète (polyurie, polydipsie...) associés à une glycémie > 2 g/1 à tout moment de la journée.
ou
• Glycémie à jeun > 1,26 g/1 (jeûne : absence de prise alimentaire calorique depuis au moins 8 h)
ou
• Glycémie à jeun > 2 g/1 à la deuxième heure d'une HGPO (dans les conditions définies par l'OMS : 75 g de glucose dissous dans de l'eau).

En l'absence d'une hyperglycémie franche avec troubles métaboliques aigus, ces critères doivent être confirmés par une deuxième analyse un jour ultérieur. L'HGPO n'est pas recommandée en routine.

Au cours d'une HGPO*

	Valeurs normales	« Impaired fasting glucose »	Intolérance au glucose	Diabète sucré
T_0 mmol/1	<6,1	6,1-7,0		>7,0
g/1	<1,10	1,10-1,26		>1,26
T_{120} mmol/l	<7,8		7,8-<11,1	>11,1
g/1	<1,40		1,4-<2,0	≥ 2,0

* pour le diagnostic du diabète gestationnel, une épreuve de dépistage est pratiquée avec 50 g de glucose ; si la glycémie est > 1,40 g/1 à T 60, un test de diagnostic avec 100 g de glucose est alors pratiqué (diabète si deux glycémies retrouvées >. 1,05 g/1 pour TO, > 1,90 g/1 à T 60, > 1,65 g/1 à T 120, S 1,45 g/1 à T 180).

2.3.1.2. Hyperglycémie provoquée par voie veineuse

Elle est destinée à supprimer la traversée digestive du glucose et la sécrétion insuline-stimulante des hormones pariétales.

Elle explore le coefficient d'assimilation du glucose K. Les mêmes précautions de base doivent être prises que pour l'hyperglycémie provoquée par voie orale.

Une glycémie à jeun à temps zéro est prélevée, puis une injection intraveineuse de 25 g de glucose, sous forme de soluté hypertonique, est effectuée en 4 à 6 minutes. Les échantillons sont prélevés toutes les 10 minutes pendant 90 minutes pour dosage de la glycémie. Celle-ci s'élève en moins de 5 minutes et rejoint sa base en 60 minutes environ en décroissance exponentielle, qui permet de calculer K, normalement autour de 1,74 10^{-2}.

2.3.2. *Hyperglycémies provoquées sensibilisées*

- *Test à la cortisone glucose :* 50 mg d'acétate de cortisone sont donnés per os, 8 heures puis 2 heures avant une hyperglycémie provoquée. Toute glycémie dépassant 7,75 mmol/1 à la deuxième heure témoigne d'un diabète latent.
- *Test à l'insuline glucose* : 30 g de glucose *per os + 5* U d'insuline doivent se compenser et la glycémie ne bouge pas chez le sujet normal.

2.3.3. *Épreuves d'hypoglycémie*

Les épreuves d'hypoglycémies provoquées sont dangereuses et doivent se dérouler en milieu hospitalier et sous surveillance stricte : on doit pouvoir pratiquer dans la minute, une injection de glucagon ou une intraveineuse de sérum glucose hypertonique dès l'apparition (souvent très rapide) des signes cliniques d'hypoglycémie.

2.3.4. Dosages et épreuves complémentaires

2.3.4.1. Insulinémie

Jusqu'en 1960, seules les méthodes biologiques étaient utilisées. Elles consistaient à mesurer la consommation de glucose par le tissu adipeux épididymaire du rat ou l'abaissement provoqué de la glycémie chez le lapin.

Ainsi a été définie *l'unité d'insuline d'usage courant en diabétologie :*

1 unité U = 0,04 mg = 40 µg.

Chez l'homme, une unité d'insuline « métabolise » 3 à 4 g de sucre, un adulte sain sécrète environ 50 à 70 U d'insuline par jour, ce qu'il faut pour métaboliser la consommation quotidienne courante de l'ordre de 200 à 300 g de glucides. La sécrétion de base serait d'environ 1 U/heure soit 40 **µg.**

Actuellement **les méthodes de dosage** reposent :

- soit sur des *techniques radio-immunologiques.*

C'est en 1960 que S. Berson et R. Yallow ont proposé cette méthode. Elle devait rapporter à Rosalyn Yallow le prix Nobel de médecine en 1977.

Cette méthode met en compétition une insuline marquée à ^{125}I et l'insuline froide présente dans l'échantillon à doser, au niveau d'un anticorps spécifique des sites immunologiques de l'insuline. L'insuline marquée résiduelle restant

libre sera séparée, sa quantité sera inversement proportionnelle à la quantité présente dans l'échantillon ; la courbe d'étalonnage sera hyperbolique et linéarisée par transformation mathématique ;

- soit sur des *techniques immunoemymatiques* (cf. chapitre 9).

L'insuline à doser est prise en sandwich entre un anticorps fixé sur un support solide et un anticorps marqué par une enzyme dont l'activité facilement mesurable, est proportionnelle à la quantité d'insuline présente dans l'échantillon.

L'insulinémie de base matinale après plus de 10 heures de jeûne se situe entre 10 et 20 mU/1 (0,4 à 0,8 µg/l). Après un repas mixte habituel elle s'élève entre 100 et 160 mU/1.

Les résultats n'ont de sens que dans la mesure où ils sont comparés à ceux de la glycémie en particulier sous stimulation. Au cours d'une hyperglycémie provoquée, les valeurs moyennes sont données dans le tableau 6.2 :

Tableau 6.2 • Valeurs moyennes de la glycémie et de l'insulinémie au cours d'une hyperglycémie provoquée.

Temps	Glycémie	Insulinémie
0	5 mmol/1	10 à 20 mU/1
30'	8 mmol/1	30 à 50 mU/1
60'	7 mmol/1	60 à 70 mU/1
90'	6 mmol/1	30 à 50 mU/1
120'	5 mmol/1	20 à 30 mU/1

Remarque : l'insulinémie est totalement dépourvue de valeur chez le diabétique insulinodépendant.

2.3.4.2. Peptide C. Test au glucagon

Les dosages du peptide C permettent de remplacer les dosages d'insuline lorsque ceux-ci ne peuvent être faits (par exemple sujet insuline). En effet, le peptide C est sécrété par la cellule (3 en même temps et en quantité équimolaire de celle de l'insuline. Sa durée de vie est plus longue et facilite les dosages.

On étudie souvent le peptide C sous stimulation du pancréas endocrine par *le test au glucagon* (1 mg par voie intraveineuse ou intramusculaire). Les dosages sont faits au bout de 4, 6, 10, 20 minutes.

Les taux sont de 1 à 2 ng/ml à jeun et s'élèvent rapidement vers la 4e à la 6e minute où ils atteignent le double du taux de base.

2.3.5. *Autres examens*

Ces examens seront utilisés dans le cadre de la surveillance du diabète, de ses complications, de son typage.

2.3.5.1. *Protéines « glyquées »*

On sait que toutes les protéines sanguines ou tissulaires sont susceptibles de se lier spontanément au glucose sanguin et que cette liaison est d'autant plus facile que la concentration en glucose est importante.

Biochimiquement, il s'agit d'une **réaction spontanée en deux temps :**

- Liaison du glucose avec un acide aminé N-terminal et formation d'une aldimine instable (ou base de Schiff), réaction qui est réversible.
- Formation d'une cétoamine (ou cétamine), par réarrangement d'Amadori, réaction qui est pratiquement irréversible.

L'exemple le plus représentatif (figure 6.5) est celui de la globine, partie protéique de l'hémoglobine, qui en se liant au glucose forme l'hémoglobine « glycosylée ». Ce terme est mauvais car il suppose une glycosylation enzymatique, ce qui n'est pas le cas. C'est la raison pour laquelle la traduction de l'anglais « *glycated* » est utilisée donnant le terme d'hémoglobine « glyquée ».

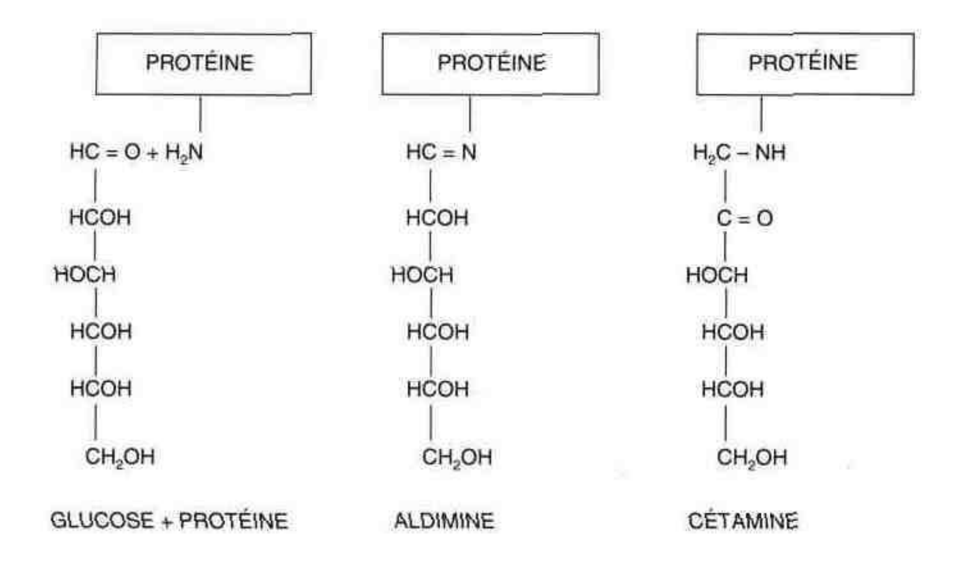


Figure 6.6 • **« Glycation » de la** chaîne B de l'hémoglobine A.

Compte tenu de la durée de vie des hématies qui est de 120 jours, nous avons l'intégration des variations glycémiques de 6 à 8 semaines précédentes.

Ainsi, la multiplication des poussées hyperglycémiques entraînera l'augmentation du taux de ce marqueur dont le résultat représente l'ambiance glycémique moyenne dans la période glycémique considérée.

Le globule rouge contient normalement de l'hémoglobine adulte A. Cette hémoglobine est faite de plusieurs fractions différentes Ala, Alb, Aie. Normalement les hémoglobines glyquées Al représentent 4 à 6 %. Cependant l'hémoglobine « glyquée » Aie est plus stable et pratiquement spécifique.

t ***Son taux normal habituel est d'environ 5 % (tableau 6.3).***

F À la fin des années 1970, plusieurs méthodes chromatographiques, sur mini colonnes avec résine échangeuse de cations faiblement acide, se sont développées pour séparer « les hémoglobines rapides » ($HbA1_{a+b+c}$).

Malgré quelques problèmes de reproductibilité dus à l'influence de la température, l'interférence des lipides et la non élimination de l'aldimine (pré $HbA1_c$), ces méthodes ont été largement utilisées en routine par les laboratoires d'analyses.

Au début de l'année 1983, un système utilisant une double élution sur microcolonne a été développé. Il permet la mesure de la fraction HbAlc spécifique et n'est pas affecté par l'interférence des hyperlipémies ou de l'aldimine. Les problèmes de reproductibilité dus à la température ont été éliminés par l'utilisation d'étalons secondaires inclus dans chaque série d'analyse et utilisés pour calculer le pourcentage de l'HbAlc.

Ces dernières années, la nécessité d'améliorer l'exactitude et la précision des dosages de l'hémoglobine Aie a fait développer des méthodes de chromatographie liquide haute performance (HPLC) par échange d'ions qui permettent une mesure spécifique avec automatisation de la technique sans interférence de l'hyperlipémie, de la base de Schiffni des variations de température (Annexe 3).

Tableau 6.3 • Composition des hémoglobines de l'adulte normal.
(Source BIO-RAD. Document Diamat.)

Sous-unité Hémoglobine	Structure	Hydrate de carbone	Concentration
Hémoglobine A_0	$\alpha_2\beta_2$	–	>90%
Hémoglobine HbA_2	$\alpha_2\delta_2$	–	< 1,5 %
Hémoglobine HbF	$\alpha_2\gamma_2$	–	<0,8,%
A_1a_1	$\alpha_2(\beta\text{-F-D-P})_2$	Fructose 1 6 diphosphate	
A_1a_2	$\alpha_2(\beta\text{-G-6-P})_2$	Glucose-6-phosphate	< 1 %
HbA_1 A_1b	7	7	
A_1c	$\alpha_2(\beta\text{-G})_2$	Glucose	4-6%
A_1d	7	?	Trace
A_1e	?		7

De la même façon, l'ensemble des protéines plasmatiques glyquées, sous forme de céto-amine, représente ce que l'on appelle **les fructosamines.**

Le dosage des fructosamines repose sur la réduction en milieu alcalin d'un sel de tétrazolium par les fonctions céto-amines des protéines glyquées pour produire un formazan dont la coloration est évaluée par spectrophotométrie.

Ce dosage permet une étude rétrospective de l'ambiance glycémique sur une période plus courte de 2 *à 3 semaines.*

Normalement le taux est de 165 à 285 ***µmol/l.***

Ce taux dépend de la concentration en protéines. Pour éviter les erreurs d'interprétation dues à de trop grandes variations de ce taux, la concentration des fructosamines peut être *rapportée à la concentration en protéines.*

La zone de référence est alors de 230 à 390 ***µmol/100*** *g de protéines.*

Le phénomène de glycation des protéines a un rôle très important dans la pathogénie des complications à long terme du diabète, diminution de la déformabilité des globules rouges (troubles hémorrhéologiques), atteinte du collagène sous-endothélial des vaisseaux (angiopathies) et de la basale glomérulaire (néphropathies), altération moléculaire des protéines soufrées du cristallin (cataracte).

2.3.5.2. Corps cétoniques urinaires et sanguins

La présence de corps cétoniques provient du catabolisme lipidique lorsque les cellules manquent de glucose. On peut les observer dans les urines dans deux circonstances :

- *le diabète sucré décompensé ;* ils accompagnent alors **une** glycosurie importante et une hyperglycémie ;
- *une cétose déjeune* et dans ce cas la glycosurie est absente.

Au niveau du sang, normalement ***l'acéto-acétate est situé entre 20 et 80 µmol/l et le*** /3 ***hydroxy-butyrate entre 60 et 170 µmol/l***.

Cependant ces derniers dosages n'ont que peu d'utilisation clinique.

2.3.5.3. Lactate et pyruvate

Ces anions se dosent en cas de coma par acidose lactique.

Normalement **le lactate** représente ***0,3 à 1,3 mmol/l.***

Son augmentation est parfois à l'origine du trou anionique que l'on peut mettre en évidence en effectuant un BES.

Le prélèvement doit être fait sans garrot, en présence d'un inhibiteur de la glycolyse et centrifugé dans les deux heures qui suivent.

Le pyruvate doit être prélevé dans les mêmes conditions, dans un tube contenant de l'acide perchlorique (qui précipite toutes les protéines et en particulier les enzymes). Dans les deux cas, il est préférable d'amener le prélèvement au laboratoire dans de la glace fondante et dans les délais les plus brefs.

Normalement le pyruvate est à un taux de ***30 à*** *70* ***µmol/l***.

Pour l'interprétation il faut tenir compte du rapport lactate/pyruvate qui est voisin de 10/1. Le jeûne fait chuter la lactatémie, l'exercice l'augmente.

p. *Variations pathologiques*

3.1. Hypoglycémies

(Glycémies < 2,8 mmol/1 (0,50 g/1))

Qu'elles soient **fonctionnelles** (souvent induites par l'absorption digestive de glucose ou hypoglycémie post stimulative de CONN) ou **organiques** (adénome langerhansien, tumeur extrapancréatique, hypopituitarisme, atteintes hépatiques virales, toxiques, cancéreuses et glycogénoses), les hypoglycémies ont généralement un **aspect clinique** bien précis : sueurs, obnubilation, vertiges, sensation de faim, convulsions et coma.

Leur exploration biologique s'appuie sur les épreuves suivantes :

- étude de la glycémie dans la journée,
- hyperglycémie provoquée par voie orale prolongée sur 5 heures,
- hypoglycémie provoquée au tolbutamide,
- dosage de l'insulinémie.

8.2. Hyperglycémies

II n'existe pas de classification entièrement satisfaisante du diabète sucré. Cependant une classification de l'OMS a le mérite d'exister, d'être comprise par tous et elle est la plus utilisée en attendant le moment où une meilleure classification interviendra.

3.2.1. Définition

Les travaux des différentes commissions internationales recommandent de définir le diabète sucré comme une **augmentation chronique anormale du taux de glucose sanguin** (hyperglycémie).

Cette hyperglycémie peut s'accompagner de *symptômes* tels que soif, polyurie, amaigrissement, troubles de la conscience et évoluer en l'absence de traitement vers le coma et la mort.

Dans d'autres cas, les symptômes sont beaucoup moins marqués, voire absents.

Les risques à long terme résident dans la survenue de *complications rétiniennes, rénales, des nerfs périphériques et l'augmentation du risque d'athérosclérose au niveau des artères cérébrales, coronaires et des membres inférieurs.*

3.2.2. *Physiopathologie*

Elle est résumée dans la figure 6.7, d'après Reach et Assan (5).

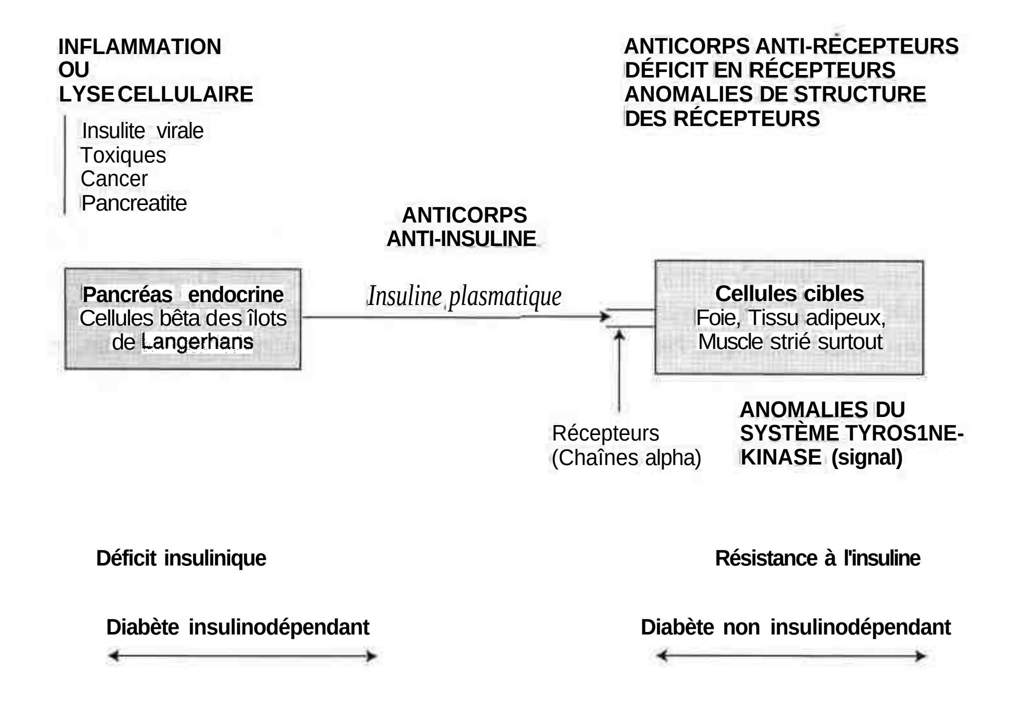


Figure 6.7 • Physiopathologie du diabète sucré.
(D'après Reach et Assan (5).)

3.2.3. *Classification internationale du diabète sucré selon l'OMS*

> CLASSIFICATION CLINIQUE

• *Diabète sucré :*

Diabète insulinodépendant (DID)
Diabète non insulinodépendant (DNID)
- sujet obèse
- sujet non obèse

Diabète de malnutrition
Diabète secondaire ou associé à :
- maladies pancréatiques
- maladies endocriniennes
- traitements ou chimiothérapies
- anomalies de l'insuline ou de ses récepteurs

- syndromes génétiques
- divers

Anomalie de la ***tolérance au glucose :***

Sujet obèse
Sujet non obèse
Associée à certaines situations ou syndromes

- ***Diabète gestationnel***

~> CLASSIFICATION STATISTIQUE **(sujet ayant une tolérance au glucose normale** mais avec des risques importants de développer un diabète) :

- Anomalie antérieure de la tolérance au glucose
- Anomalie potentielle de la tolérance au glucose

En pratique sont à retenir DID, DNID, intolérances au glucose et facteurs de nsque.

- *Le diabète insulinodépendant (DID)* est caractérisé par son début en général rapide ou brutal survenant surtout chez le sujet jeune.

Il est en général définitif, du fait de la destruction complète du pancréas endocrine. Les complications rétiniennes, rénales et nerveuses surviennent au bout de plusieurs années. Les méthodes de traitement et d'autosurveillance permettent d'augmenter la longévité et de diminuer la fréquence et la gravité des complications (figure 6.8)

- *Le diabète non insulinodépendant (DNID)* représente 80 à 85 % des cas de diabète. Il comporte un élément génétique non encore complètement élucidé. Il est le plus souvent associé à une obésité. Son début est progressif et il est souvent découvert lors d'un examen systématique. L'hyperglycémie est longtemps modérée. L'évolution se fait souvent vers le diabète insulinodépendant, par épuisement du pancréas endocrine restant.

En cas d'obésité la réduction pondérale permet souvent d'obtenir une rémission.

Les complications micro-angiopathiques peuvent survenir comme en cas de DID mais sont en général moins sévères. En revanche les complications cardio-vasculaires sont plus fréquentes.

- *La diminution de la tolérance au glucose* est d'évolution difficile à prévoir car 1/3 des sujets peuvent revenir à la normale.

- *Les facteurs de risque de diabète* doivent être pris en compte lorsqu'on surveille un sujet pour toute raison médicale.

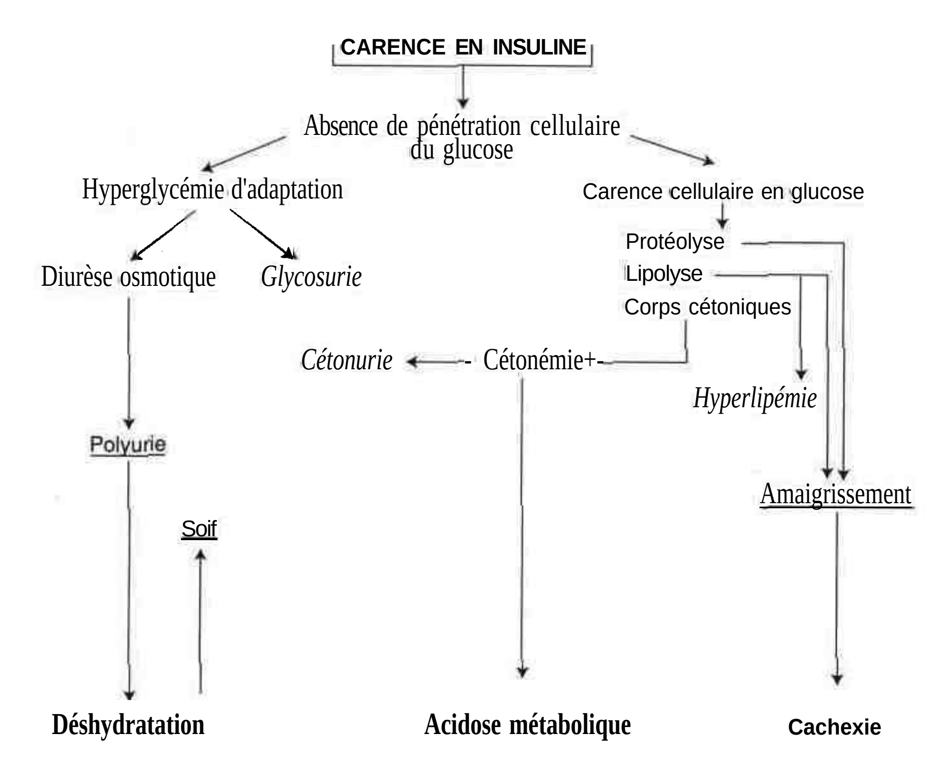


Figure 6.8 • Conséquences de la carence en insuline.

Ces facteurs sont :

- *existence de diabétiques dans la famille* (surtout s'il en existe à la fois du côté du père et de la mère) ;
- *obésité importante* (> 25 % du poids idéal) ;
- *antécédents obstétricaux chez une femme, d'enfants pesant plus de 4 kg à la naissance ;*
- *augmentation franche de la glycémie lors de la prise de certains médicaments :* pilule contraceptive, corticoïdes, diurétiques ;
- *certains groupes tissulaires HLA* (DR3, DR4).

Au total les deux grands types de diabètes sont résumés dans le tableau 6.4.

Tableau 6.4 • Comparaison entre DID et DNID (4).

	DID	DNID
Clinique		
Âge	< 30 ans	< 40 ans
Début	Rapide	Progressif
Poids	N	++
Cétose	+++	0
Complications	+++	++
Épidémiologie		
Prévalence	0,5%	2%
Génétique		
Jumeaux	50%	>80%
HLA	DR3, DR4	?
Anatomie Pathologique		
Lésions d'insulite	+	0

4. *Annexes*

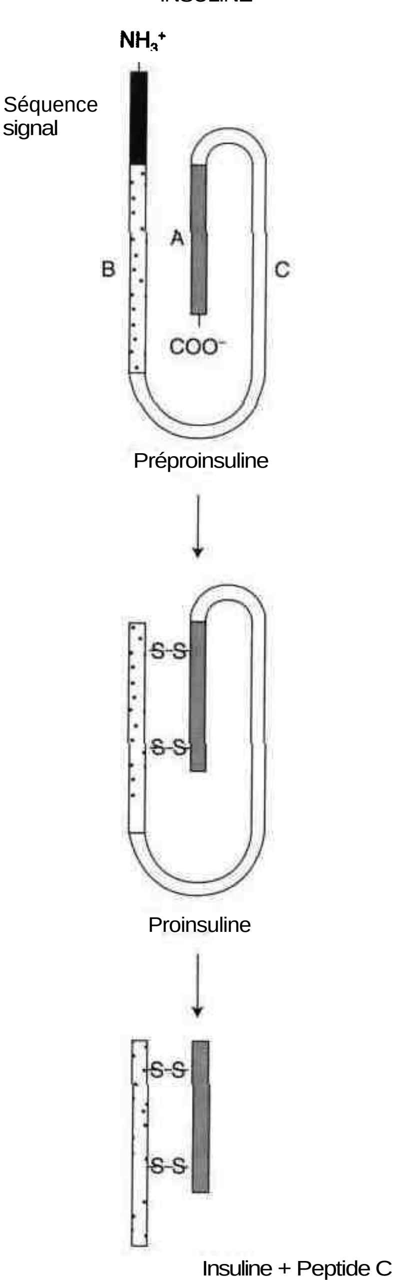
Annexe 1 :

COMPOSITION EN GLUCIDES DES PRINCIPAUX ALIMENTS

Aliments avant cuisson	Glucides en pourcentage
- Fromage	0%
- Graisses	0%
– Œuf	0%
- Poissons	0%
- Viandes	0%
- Lait	5%
- Laitage	5%
- Légume vert	5%
- Artichaut	10%
- Betterave	10%
- Carotte	10%
- Céleri	10%
- Navet	10%
- Petit pois	10%
- Fruit frais	15%
- Raisins	15%
- Banane	20%
- Pâtes	20%
- Pomme de terre cuite	20%
– Riz	20%
- Pain	55%
- Biscotte	75%

Annexe 3 :

CONVERSION ENZYMATIQUE **DE** LA PRÉPROINSULINE EN PROINSULINE PUIS EN INSULINE



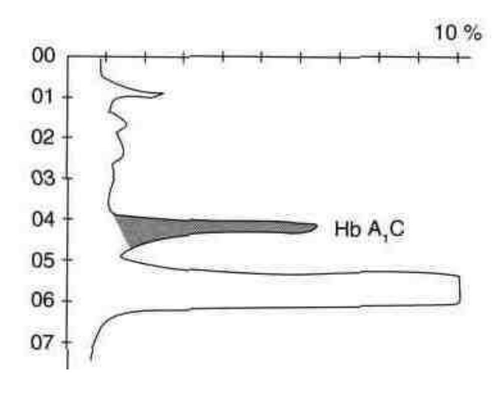
EXEMPLE DE TRACÉ **D'HPLC**

HEMOGLOBIN REPORT

TIME 91-09-25 11:32
SAMPLE N0. 006

NAME	%	TIME	AREA
A1A	**0.6**	**1,6**	**25.34**
AIB	0.8	2.3	29.84
F	0.3	3.0	13.49
A1C	6.1	4.2	221.12
AO	92.1	5.8	3590.72
	TOTAL		**3898.19**

HBA1C 6,1 % HBA1 7,5%



Références bibliographiques

Bernard S. *Biochimie Clinique*, Maloine, Paris, 1989 (2e éd.)

Document BIO-RAD. *Diamat Hb Aie ReorderPack,* réf. 961-204, avril 1988, p. 25.

Jambel S. et Pugeat M. *Diabète non insulino-dépendant.* Rev. **Prat.**, 1992, 42, 2245.

Piriemuter L. et Collin de l'Hortet G. *Abrégé de diabétologie,* Masson, Paris, 1987.

Reach G. et Assan R. *Physiopathologie du diabète sucré.* Gazette Méd. France, 1981, 88,4035.

American Diabètes Association : *Self-monitoring of blood glucose :* Diabètes Care, 1994,17, 81.

Henquin J.C. et Gilon P. *Médecine et science,* 1995,11,1235.

7

Métabolisme des lipides et des lipoprotéines

Marie-Laure Solera

L'importance du métabolisme lipoprotéique est liée à la fréquence des hyperlipoprotéinémies et à leur retentissement sur la paroi artérielle. En effet, différents facteurs de risque cardiovasculaire ont pu être identifiés :

r - des facteurs cliniques : obésité, sédentarité, hypertension artérielle, tabagisme, stress répété,

- des facteurs biologiques : hyperlipoprotéinémie, hyperglycémie, hyperuricémie, une augmentation de l'hématocrite et du fibrinogène.

Parmi tous ces facteurs, trois sont particulièrement importants : **l'hypertension, le tabagisme et l'hypercholestérolémie.**

Il a été établi une relation certaine entre le niveau de la cholestérolémie et la fréquence des atteintes cardio-vasculaires. Ainsi l'athérome peut provoquer des coronaropathies, des accidents vasculaires cérébraux et une artériopathie des membres inférieurs.

|J. *Structure des lipoprotéines*

Les lipides plasmatiques insolubles en milieux aqueux circulent dans le plasma liés à des protéines spécifiques les apolipoprotéines et forment des complexes macromoléculaires : les lipoprotéines.

Les lipides polaires constituent la zone périphérique : cholestérol libre (CL), phospholipides (PL) et apoliprotéines ; le noyau est formé de lipides hydro-,phobes : triglycérides (TG) et esters de cholestérol (CE).

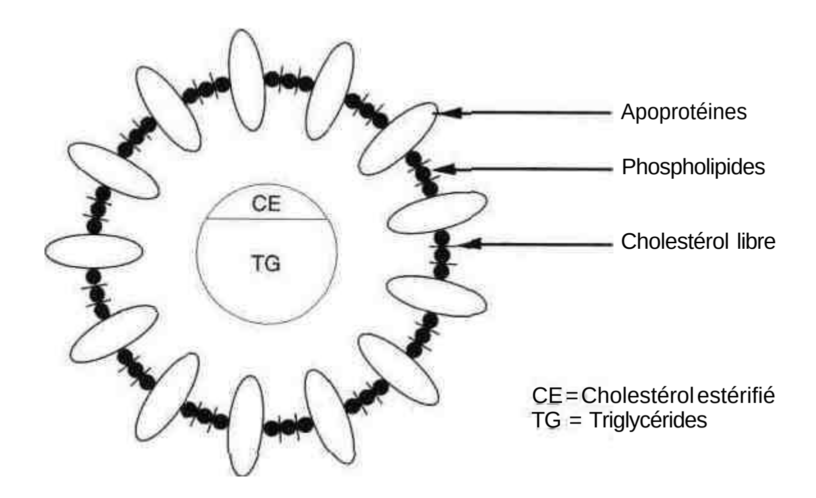


Figure 7.1 • Structure des lipoprotéines.

1.1. Classification des lipoprotéines

Les quatre classes de lipoprotéines : chylomicrons, « *very low density lipoproteins* » (VLDL), « *low density lipoproteins* » (LDL), « *high density lipoproteins* » (HDL), peuvent être séparées selon leur densité de flottation.

Leurs différentes propriétés physiochimiques sont regroupées dans les tableaux 7.1 et 7.2

Tableau 7.1 • Caractéristiques physiques des différentes lipoprotéines.

Lipoprotéines	Densité (g/ml)	Poids moléculaire moyen	Diamètre (nm)
CHYLOMICRONS	<0,94	5.10^9	10^2-10^3
VLDL	0,94 à 1,006	$7,5.10^6$	30-70
LDL			15-25
LDL_1 (IDL)*	1,006 à 1,019	$2,5.10^6$	
LDL_2	1,019 à 1,063		
HDL			
HDLi	< 1,063		
HDL_2	1,063 à 1,125	$3,9.10^5$	6-14
HDL_3	1,125 à 1,210	$1,9.10^5$	6-10

* **IDL** = *intermediary density lipoproteins.*

Tableau 7.2 • Composition des principales lipoprotéines.

Fractions	lipidiques	(% poids)			Apoprotéines
;	TG	CL	CE	PL	Majeures
chylomicrons	86-94 %	0,5-1 %	1-3 %	3-8 %	1-2 % AI, AU AIV, B48
VLDL	55-65%	6-8%	12-14%	12-18%	5-10% B100 CI, Cil, CIII
LDL	8-12%	5-10%	33-40%	20-25%	20-24% B100
HDL	3-6%	3-5%	14-18%	20-30%	45-50% AI, AU ci, en, cm

1.2. Classification des apolipoprotéines

Situées à la périphérie des lipoprotéines, elles permettent leur solubilisation et leur transport sanguin. Elles ont un double rôle :

• *Un rôle structural* de maintien du complexe macromoléculaire pour le transport des sites de synthèse vers les sites d'utilisation ;

• *Un rôle métabolique :*

- en permettant **la reconnaissance des sites récepteurs** à apolipoprotéines B etE,

- en étant **effectrices d'enzymes,** par exemple :

l'apo AI est activatrice de la lécithine cholestérol acyl transférase (LCAT), enzyme estérifiant le cholestérol des HDL ;

l'apo Cil est activatrice de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme située sur l'endothélium des capillaires, hydrolysant les triglycérides des chylomicrons et des VLDL.

L'apolipoprotéine E a également un rôle important dans l'épuration hépatique des « remnants » et des IDL par sa liaison avec le récepteur à Apo E alors que l'apo CIII inhibe la captation de ces lipoprotéines et s'oppose à l'effet activateur de l'apo Cil sur la lipoprotéine lipase.

Leurs caractéristiques et principales propriétés sont regroupées dans le tableau 7.3.

Les apolipoprotéines les plus importantes sont **l'apolipoprotéine B et l'apo-lipoprotéine Al.**

L'apo B est l'apoprotéine des lipoprotéines athérogènes, les LDL et VLDL ; l'apo AI est la principale apoprotéine des lipoprotéines « protectrices » de l'athérome, les HDL.

Tableau 7.3 • Caractéristiques des principales apolipoprotéines.

Apo-protéines	Poids moléculaires	Fonctions	Concentrations plasmatiques	Sites de synthèse	VLDL %	LDL %	HDL %
					de la fraction protéique		
ApoAl	28000	activateur LCAT permet efflux du cholestérol	1,10à2g/l	Foie, intestin	4		67
Apo AU	17000	stmcture des HDL	0,4 g/1	Foie, intestin			22
ApoAIV	45000	permet efflux du cholestérol	0,15 g/1	Intestin			
ApoB100	550000	sécrétion VLDL ligand du récepteur LDL	0,6 à 1,40 g/1	Foie	35	90	
ApoB48	264000	sécrétion chylomicrons	0,03 à 0,05 g/1	Intestin			
Apo CI	6600	activateur LCAT (in vitro)	0,04 à 0,06 g/1	Foie			
Apo CT	8800	activateur LPL	0,03 à 0,05 g/1	Foie	40		5-9
Apo CM	8700	inhibiteur LPL	0,12 à 0,14 g/1	Foie			
ApoD	33000	métabolisme des esters du cholestérol	0,06 à 0,07 g/1	Gonades, rein, foie, placenta, intestin			
ApoE	34000	ligand du récepteur LDL et du récepteur IDL	0,03 à 0,05 g/1	Foie, intestin, surrénales, macrophages cerveau	13		

2. *Métabolisme des lipoprotéines*

Les lipoprotéines sont synthétisées avec des lipides d'origine endogène ou exogène.

2.1. Apports lipidiques endogènes

La synthèse endogène de *triglycérides* est effectuée **dans le foie à partir du glucose.**

Les acides gras libres peuvent être libérés par l'adipocyte et transportés par la sérum albumine jusqu'au foie où ils participeront également à la synthèse endogène des triglycérides.

Le cholestérol peut être synthétisé à partir de l'acétyl CoA et cette synthèse représente 800 mg/jour.

2.2. Apports lipidiques exogènes

t-

Les lipides alimentaires sont d'origine végétale (riches en acides gras (AG) insatures) et animale (AG saturés). **Ces AG** sont apportés sous forme de triglycérides et de phospholipides.

L'apport de cholestérol est de 200 mg/j.

Ces lipides sont dégradés dans le tube digestif avec la **lipase pancréatique et l'intervention des sels biliaires.** Ces sels biliaires permettent la fixation de la colipase activatrice de la lipase et ont une action émulsionnante sur les graisses (en absence de sels biliaires lors de l'obstruction du canal cholédoque par des calculs ou une tumeur, les selles seront riches en graisses non dégradées ce qui provoquera une stéatorrhée).

Les catabolites lipidiques obtenus, **AG,** Glycérol, monoglycérides et diglycérides sont absorbés par la muqueuse intestinale.

2.3. Métabolisme des lipoprotéines riches en triglycérides

2.3.1. Origines des chylomicrons et des VLDL

Les lipoprotéines riches en triglycérides sont synthétisées par **l'intestin** pour les **chylomicrons et une faible partie des VLDL** (20 %) avec des lipides d'origine exogène. Ces lipoprotéines d'origine intestinale sont libérées dans la lymphe puis circulent dans le sang. **Les VLDL sont principalement synthétisées par le foie** avec des triglycérides d'origine endogène.

Chylomicrons et VLDL vont subir l'action de **la lipoprotéine lipase** (LPL) de l'endothélium des capillaires qui dégradera leurs triglycérides en AG et glycérol. La LPL est activée par l'apo Cil cédée préalablement par les HDL, véritables « réservoirs d'apo C ». Les AG libérés peuvent soit subir la (3 oxydation Let libérer de l'énergie pour différents tissus, soit être stockés par les adipocytes tous forme de triglycérides de réserve.

\.3.2. Devenir des chylomicrons et VLDL

Après l'action de la LPL sur ces deux lipoprotéines, les chylomicrons sont transformés en particules résiduelles ou « **remuants** » et les VLDL en lipoprotéines intermédiaires, les IDL. Les « remnants » sont reconnus par le récepteur à apo B/E du foie et sont dégradés. Plusieurs types de récepteurs ont été décrits proches du récepteur-LDL en particulier le « LDL Receptor Related Protein » ou LRP qui permet aussi l'épuration des « remnants » avec reconnaissance de l'apo E.

De même **les lipoprotéines intermédiaires IDL** tout en continuant à subir l'action de la LPL, viendront également se fixer sur les récepteurs hépatiques. Les apo E3 et E4 sont reconnues par ces récepteurs mais pas l'apo E2 ce qui

pourra provoquer une hyperlipoprotéinémie avec accumulation d'IDL. Les IDL subissent alors l'action probable de **la triglycéride lipase hépatique** pour être transformées en LDL.

2.4. Devenir des LDL

Les LDL ainsi formées se composent d'apo B, de cholestérol libre et estérifié. Elles circulent dans le sang vers les tissus périphériques et le foie. Elles sont reconnues par les **récepteurs à apo B/E.** Une anomalie quantitative ou qualitative du récepteur apo B/E ou une modification de la LDL pourra entraîner une dyslipoprotéinémie.

Après fixation sur le site récepteur, la LDL est intemalisée et dégradée en cholestérol libre, acide gras et acides aminés de l'apo B.

Le cholestérol libre pourra :

- *être utilisé* pour la structure des membranes,
- *être stocké* sous forme de cholestérol estérifié. Une enzyme, l'acyl cholestérol acyltransférase (ACAT) permet en effet d'estérifier le cholestérol intracellulaire avec des acyl-coenzymes A ;
- *inhiber la ƒS hydroxy ƒ3 méthylgiutaryl CoA réductase,* enzyme régulatrice de la synthèse du cholestérol,
- *inhiber la synthèse des récepteurs à apo B/E.*

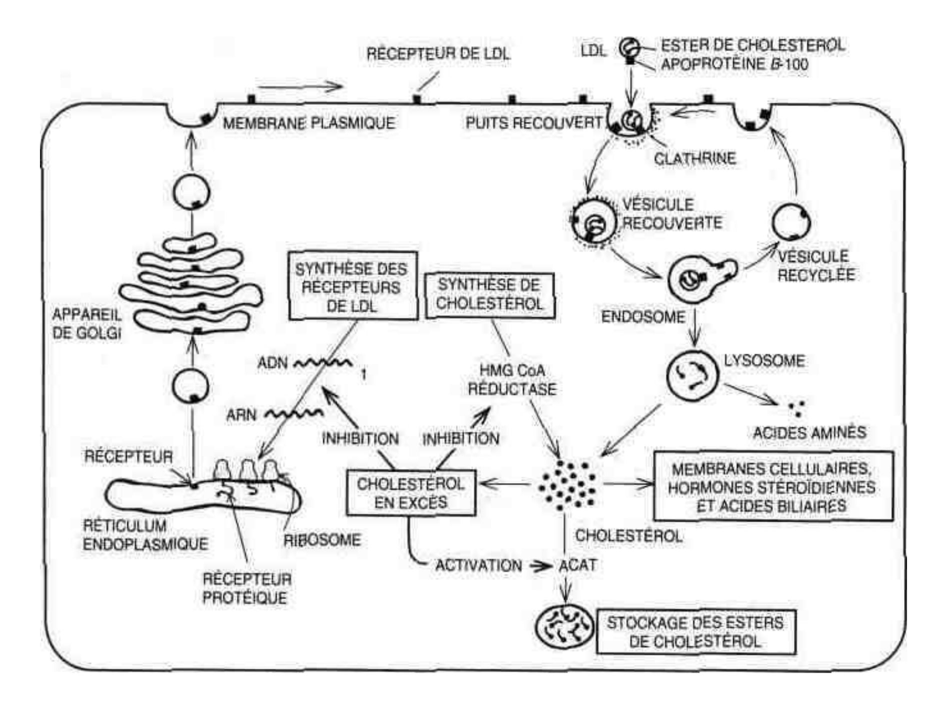


Figure 7.2 Captation et métabolisme intracellulaire du cholestérol (selon Brown et Goldstein).

Certaines LDL ne sont pas captées par les récepteurs à apo B/E car elles sont modifiées, surtout par peroxydation ou acétylation. Elles sont alors catabolisées par la voie du récepteur « scavenger » des macrophages. Ce récepteur n'est pas régulé par le taux de cholestérol et le macrophage pourra absorber un excès de LDL et se transformer en cellule spumeuse. Ce mécanisme peut être une des causes de l'installation de la lésion athéroscléreuse.

Le cholestérol libre cellulaire en excès pourra être pris en charge par les HDL (« efflux » du cholestérol) pour être ramené au foie et y être dégradé.

2.5. Métabolisme des HDL

Les HDL plasmatiques ont plusieurs origines : sécrétion par l'intestin et par le foie, formation à partir des chylomicrons et des VLDL. Au cours de la lipolyse, il y a en effet des échanges permanents de lipides et d'apoliprotéines entre les différentes classes de lipoprotéines. Phospholipides et apo A sont détachés de la surface des lipoprotéines riches en triglycérides lors de la lipolyse et contribuent à la synthèse des HDL.

Les HDL ont été divisées en quatre sous classes : HDL_1, HDL_2, HDL_3 et les lipoprotéines de très hautes densités (VHDL). HDL_2 et HDL_3 sont les plus importantes et correspondent aux principales étapes métaboliques.

Les premières HDL libérées dans la circulation sanguine ou **HDL naissantes** sécrétées par les hépatocytes ne contiennent pas de cholestérol estériiïé. Elles ont une forme de disque. Au fur et à mesure, la particule s'enrichit en cholestérol et phospholipides. Après l'estérification du cholestérol par la LCAT, le cholestérol estérifié hydrophobe se localisera au centre et transformera les disques en sphères : **les HDL_3**.

Ces HDL_3 sont des HDL de petite taille et de haute densité qui sont capables de recevoir du cholestérol et de continuer à l'estérifier avec la LCAT. Elles se transforment en HDL de plus grande taille, les **HDL_2**, de densité plus légère car plus riches en triglycérides, qui sont des transporteurs de stérides vers le foie ou les autres lipoprotéines VLDL et LDL.

Il y a un cycle permanent de conversion de HDL_2 en HDL_3 avec intervention de la lipase hépatique (représenté dans la figure 7.3).

Les HDL ont plusieurs fonctions :

• *intervenir dans la lipolyse* des chylomicrons et VLDL en leur transférant l'apo Cil activateur de la LPL et récupérer, après la lipolyse, des particules de phospholipides, cholestérol libre et apoprotéines ;

• *intervenir dans le transport « reverse » ou efflux du cholestérol* avec quatre étapes :

• *récupérer l'excès de cholestérol libre* des tissus périphériques avec l'intervention d'un récepteur spécifique à HDL. Il s'agit alors de la sous classe : HDL3;

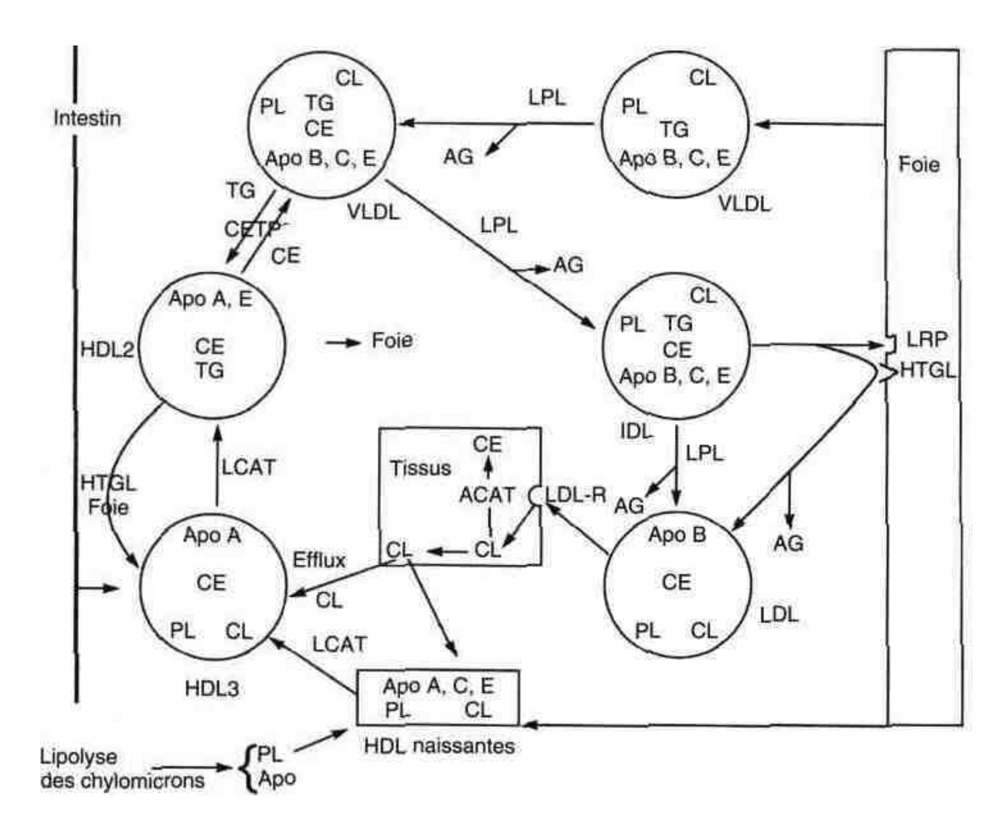


Figure 7.3 • Métabolisme des lipoprotéines.
*CETP : cholesteryl ester transfer protein.

- *permettre l'estérification du cholestérol libre* par la LCAT pour libérer les sites périphériques de la lipoprotéine. Après estérification, étant hydrophobe, il forme le noyau des HDL ;
- *échanger ce stéride* ainsi formé contre des triglycérides des LDL grâce à une protéine permettant cet échange, la CETP (« cholesteryl ester transfer protein ») ;
- *ramener au foie le cholestérol des tissus* non échangé avec les triglycérides des LDL. **HDL_2 est donc la vraie lipoprotéine antiathérogène** puisqu'elle épure l'excès de cholestérol (20 à 30 % des HDL totales).

Au niveau du foie le cholestérol libre peut alors être éliminé dans la bile ou servir à la synthèse des acides biliaires. La lipase hépatique, en hydrolysant les triglycérides et les phospholipides des HDL_2, permettrait leur retour dans la circulation sous forme de HDL_3.

2.6. Lipoparticules

Chaque classe de lipoprotéines est elle même un mélange hétérogène de « lipoparticules » distinctes, de nature et de signification biologique différentes.

Chaque lipoparticule est définie non plus par sa densité mais qualitativement par **son contenu en apolipoprotéines.**

Les unes ne comportent qu'une apolipoprotéine, exemple : la Lp AI qui ne contient que de l'apo AI. D'autres plus complexes contiennent plusieurs apolipoprotéines, exemple : la Lp-B-CIII-E.

Les particules contenant l'apo AI (principalement les HDL) comportent deux populations : les Lp AI et les Lp AI-AII.

- *Les Lp AI* sont riches en LCAT et en CETP et ont également un très faible taux d'apo AIV. **Ces lipoprotéines sont responsables de l'efflux de cholestérol des tissus périphériques vers le foie.**
- Les *Lp AI-AII* n'ont pas cette propriété.

Une autre lipoparticule est différente par son apoprotéine : *la lipoprotéine (a) ou Lp (a).*

C'est une lipoparticule caractérisée par une apoprotéine (a) (20 %), glycoprotéine liée par un pont disulfure à une apo B100 (60 %). Elle a longtemps été considérée comme une LDL. A l'état physiologique tous les sujets la possèdent. Son analogie avec le plasminogène provoque sa liaison avec les glycosaminoglycannes et protéoglycannes. Elle pourrait avoir une fonction régulatrice de l'équilibre « coagulation-fibrinolyse ».

Elle est **très athérogène** et représente un facteur de risque indépendant pour une concentration plasmatique supérieure à 0,3 g/1.

2.7. Régulation hormonale

Elle porte essentiellement sur le **métabolisme des triglycérides** dont l'importance énergétique est fondamentale.

La lipogénèse (synthèse des TG) et **la lipolyse** (catabolisme des TG) sont régulées par différentes hormones (figure 7-4).

On notera dans ce schéma simple l'importance de l'insuline et le fait que les facteurs stimulant la lipase hormonodépendante du tissu adipeux sont tous des facteurs hyperglycémiants. Ainsi la production d'énergie à partir de glucose ou à partir d'acides gras peut-elle être équilibrée.

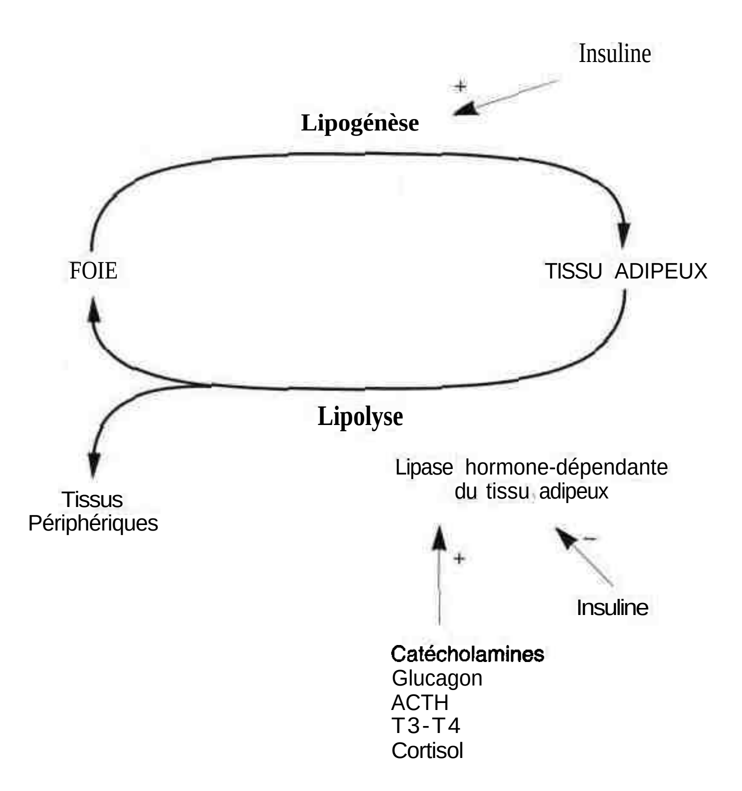


Figure 7.4 • Régulation hormonale de la lipogénèse et de la lipolyse.

3. *Bilan lipidique*

3.1. Bilan lipidique systématique

II faut un bilan de santé dès l'enfance dans les familles à risques et vers 18-25 ans chez les autres sujets. Ce bilan de première intention doit comprendre : **l'aspect du sérum à jeun et les dosages des triglycérides, du cholestérol total et du cholestérol HDL.**

ir
C

3.2. Bilan lipidique orienté

II est utilisé pour une confirmation diagnostique après une anomalie dans le bilan systématique, ou pour une surveillance de traitement ou après la découverte d'une maladie susceptible d'entraîner une hyperlipémie secondaire.

Ce bilan comprend en plus du bilan systématique **une électrophorèse des lipoprotéines, un dosage de l'apo B et de l'apo Al et éventuellement les dosages de Lp Al et Lp(a).**

3.3. Paramètres lipidiques

3.3.1. Aspect du sérum

Sur un sujet à jeun depuis 12 heures, le sérum doit être clair, c'est-à-dire avec un faible taux de VLDL et sans chylomicron. S'il est opalescent, il y a un excès de VLDL ; s'il est lactescent, des chylomicrons sont présents. Pour contrôler la présence effective de chylomicrons, le sérum est conservé 24 heures à + 4 °C et les chylomicrons forment alors une crème à la surface du sérum.

3.3.2. Dosage des triglycérides

Des techniques enzymatiques sont utilisées par plus de 90 % des laboratoires. Elles reposent sur le **dosage enzymatique du glycérol libéré après action de la lipase.** Le glycérol libre préexistant est en quantité très faible dans le sérum. On peut cependant le doser sans faire l'hydrolyse préalable des triglycérides.

La première étape est une phosphorylation du glycérol par la glycérol kinase. Selon les étapes suivantes il s'agit de dosage photométrique dans le visible ou dans l'U.V.

3.3.2.1. Dosage enzymatique calorimétrique

$$\text{Triglycérides} \xrightarrow{\text{Lipase}} \text{glycérol + acides gras}$$

$$\text{Glycérol + ATP} \xrightarrow{\text{Glycérol kinase}} \text{glycérol 3 phosphate + ADP}$$

$$\text{Glycérol 3 phosphate} + NAD^+ \xrightarrow{\text{Glycérol déshydrogénase}} \text{phospho dihydroxyacétone} + NADH + H^+$$

$$NADH + H^+ + \text{iodonitrotétrazolium} \longrightarrow NAD^+ + \text{formazan}$$

La lecture colorimétrique est effectuée à 500 nm. La coloration due au Formazan est proportionnelle à la concentration en triglycérides dans le sérum. Cette première technique enzymatique colorimétrique est en voie d'abandon.

3.3.2.2. Dosage enzymatique à l'oxydase-peroxydase

$$\text{Triglycérides} \xrightarrow{\text{Lipase}} \text{glycérol + 3 acides gras}$$

$$\text{Glycérol + ATP} \xrightarrow{\text{Glycérol kinase}} \text{glycérol 3 phosphate + ADP}$$

$$\text{Glycérol 3 phosphate} \xrightarrow{\text{Glycérol oxydase}} \text{phospho dihydroxyacétone} + H_2O_2$$

$2H_2O_2$ + phénol + amino 4 phénazone $\xrightarrow{\text{Peroxydase}}$ quinone imine colorée + $4H_2O$

La lecture colorimétrique est effectuée à 540 nm.

Cette technique est la plus utilisée actuellement (2/3 des laboratoires français la pratiquent).

3.3.2.3. Dosage enzymatique par spectroréflectométrie

II s'agit d'un dosage utilisant le même principe de reaction que le dosage enzymatique à l'oxydase-peroxydase mais pratiqué sur support solide.

Taux normaux homme < 7,5 *mmol/l ou < 1,30 g/l*
Taux normaux femme < *1,3 mmol/l ou < 1,15 g/l*

Pour établir un régime et/ou un traitement ***le seuil pathologique sera égal ou supérieur à** 2,3* ***mmol/l soit 2 g/l.***

3.3.3. Dosage du cholestérol

Le cholestérol peut être dosé par de très nombreuses méthodes. Les plus anciennes sont colorimétriques, les plus pratiquées sont enzymatiques. La méthode de référence est chromatographique.

3.3.3.1. *Méthodes enzymatiques*

Ces méthodes concernent plus de 99 % des laboratoires français. Elles utilisent toutes une **cholestérol estérase et une cholestérol oxydase.**

Dans une première étape les esters de cholestérol sont hydrolyses en cholestérol libre par l'estérase puis le cholestérol libre est oxydé en A4-cholesténone avec production d'eau oxygénée.

Les diverses techniques enzymatiques diffèrent entre elles par le dosage de cette eau oxygénée.

CE $\xrightarrow[\text{estérase}]{\text{Cholestérol}}$ *CL* + *AG* CL $\xrightarrow{O_2\text{, Cholestérol oxydase}}$ cholestène-4, one 3

(CE = Cholestérol estérifié)
(CL = Cholestérol libre)

H_2O_2 formée peut être dosée en présence de catalase ou peroxydase :

chromogène + H_2O_2 $\xrightarrow{\text{Catalase}}$ H_2O + chromogène oxydé

ou

H_2O_2 + iodure $\xrightarrow{\text{Peroxydase}}$ H_2O + iode

ou

$2H_2O_2$ + phénol + chromogène (amino 4 phénazone) $\xrightarrow{\text{Peroxydase}}$ quinone unine + $4H_2O$

- *Technique avec peroxydase et chromogène phénolique.*

Elle est pratiquée par plus de 90 % des laboratoires. La quinone imine obtenue ci-dessus est colorée en rosé et peut être dosée par colorimétrie à 540 nm ou par spectroréflectométrie. La coloration obtenue est proportionnelle à la concentration du cholestérol sérique.

Les autres techniques sont beaucoup moins utilisées.

- *Technique avec peroxydase et chromogène non phénolique.*

Avec de l'iodure, l'eau oxygénée oxyde l'iodure en iode dosé par photométrie.

- *Technique avec catalase et chromogène.*
- *Technique par spectroréflectométrie avec chromogène phénolique.*

Toutes ces techniques enzymatiques montrent une bonne spécificité et une bonne exactitude.

3.3.3.2. Techniques chromatographiques

> CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

II s'agit de la technique de référence nécessitant un matériel très spécialisé.

Après dilution isotopique, l'échantillon sérique est passé sur chromatographie en phase gazeuse suivie d'une mesure par spectrométrie de masse.

Taux normaux < 5,70 **mmol/1 ou 2,20** g/1.

Pour établir un régime et/ou un traitement, **c'est le taux de cholestérol LDL qui sera retenu mais le seuil pathologique est différent selon le nombre de facteurs de risque présenté par le patient** (tableau 7.6).

3.3.4. Dosage des phospholipides

Très peu demandé, le dosage des phospholipides (lécithines, phosphatidyl éthanolamines, phosphatidyl serines, sphingomyélines et lysolécithines) est effectué par des techniques chimiques ou enzymatiques.

> TECHNIQUES CHIMIQUES :

Elles sont pratiquées en dosant le phosphore directement ou après minéralisation par formation d'un complexe phosphomolybdique.

▶ TECHNIQUES ENZYMATIQUES

Lécithine $\xrightarrow{\text{Phospholipase D}}$ choline + acide phosphatidique

Choline $\xrightarrow{\text{Choline oxydase}}$ bétaïne + H_2O_2

$$2H_2O_2 + \text{phénol} + \text{amino 4 phénazone} \xrightarrow{\text{Peroxydase}} \text{quinone imine} + 4\ H_2O$$

La quinone imine formée est colorée en rosé et la densité optique à 540 nm est proportionnelle à la concentration des phospholipides sériques.

Taux normaux < *3,20 mmol/l ou 2,50 g/l*

3.3.5. Dosage des acides gras libres

II s'agit d'un dosage colorimétrique comportant 3 réactions successives :

$$\text{R-COOH} + \text{ATP} + \text{CoA} \xrightarrow{\text{AcylCoA synthétase}} \text{acyl CoA} + \text{AMP} + \text{PP}$$

$$\text{AcylCoA} + O_2 \xrightarrow{\text{AcylCoA Oxydase}} \text{enoyl CoA} + H_2O_2$$

$$2H_2O_2 + \text{phénol} + \text{amino 4 phénazone} \xrightarrow{\text{Peroxydase}} \text{quinone imine} + 4\ H_2O$$

La lecture colorimétrique est encore effectuée à 540 nm.

3.3.6. Dosage du cholestérol HDL

II s'effectue après précipitation sélective des LDL et VLDL avec un complexe polyanion-cation ou **avec** l'acide phosphotungstique en présence de cations bivalents.

Le cholestérol HDL est dosé par technique enzymatique sur le surnageant résultant de la centrifugation du précipité. Les TG interfèrent sur cette précipitation à partir de 4 mmol/l.

- Des dosages directs du cholestérol HDL sont actuellement proposés, le principe est de bloquer les autres lipoprotéines avec des anticorps anti apo B ou des polyanions puis le dosage du cholestérol HDL est effectué par méthode enzymatique.

Taux normaux homme **>** ***1,10*** *mmol/l ou > 0,42 g/l*
Taux normaux femme > *1,30 mmol/l ou > 0,50 g/l*

Le rapport cholestérol total/cholestérol HDL est utilisé comme **facteur de risque cardiovasculaire et doit être inférieur à 4,9 chez l'homme et à** 4,2 **chez la femme.**

3.3.7. Évaluation du cholestérol des LDL

Plus difficile à pratiquer, le dosage par précipitation sélective des LDL est peu utilisé. Un dosage direct vient d'être proposé en utilisant un détergent qui

solubilise VLDL et HDL puis les enzymes cholestérol estérase et oxydase oxydent le cholestérol HDL et VLDL en produit inactif incolore. Un deuxième réactif avec détergent, enzymes et chromogène permettra le dosage direct du cholestérol LDL.

Taux normaux < ***4,1 mmol/l ou 1,60 g/l***

Entre 4,1 et 5,7 mmol/l (1,60 à 2,20 gA) en prévention primaire chez des sujets sans autres facteurs de risque, seuls des conseils hygièno-diététiques sont nécessaires.

La formule de Friedewald permet **de calculer le cholestérol LDL** à condition que les TG soient inférieurs **à 4 mmol/l** (3,5 g/l).

Pour des concentrations exprimées en mœoJ/1 :

Chol. LDL = Chol. total - (Chol. HDL + TG/2,2)

Pour des concentrations exprimées en g/l :

Chol. LDL = Chol. Total - (Chol. HDL + TG/5,6).

Si les triglycérides sont supérieurs à 4 mmol/l (3,5 g/l) le cholestérol LDL peut être calculé par la formule de Planella : Chol. LDL (mmol/l) =
0,41 Chol. total (mmol/l) - 0,32 TG (mmol/l) + 1,7 apo B(g/l) - 0,27.

3.3.8. Dosage des apoprotéines AI et B

Les deux principales apoprotéines peuvent être dosées par différentes techniques immunologiques avec antisérums spécifiques et étalons purifiés.

I - Les méthodes automatisées utilisées sont *l'immunonéphélémétrie et l'immunoturbidimétrie.*

Mais pour les petites séries de dosages, *l'immunodiffusion radiale, l'électroimmunodiffusion et l'immunoenz.ymologie* sont aussi pratiquées.

| - Les autres apoprotéines utiles pour un diagnostic, apo Cil et apo E, sont aussi évaluées avec leur anticorps correspondant par techniques immunologiques.

Taux normaux apo B = ***0,6 à 1,40 g/l***
Taux normaux apo AI > ***1,10 g/l.***

3.3.9 Dosage de la lipoparticule Al

Ce dosage s'effectue par électroimmunodiffusion avec des anticorps anti AI et anti Ail.

Taux normal LpAl > **0,35 g/l.**

3.3.10. Dosage de la Lp (a)

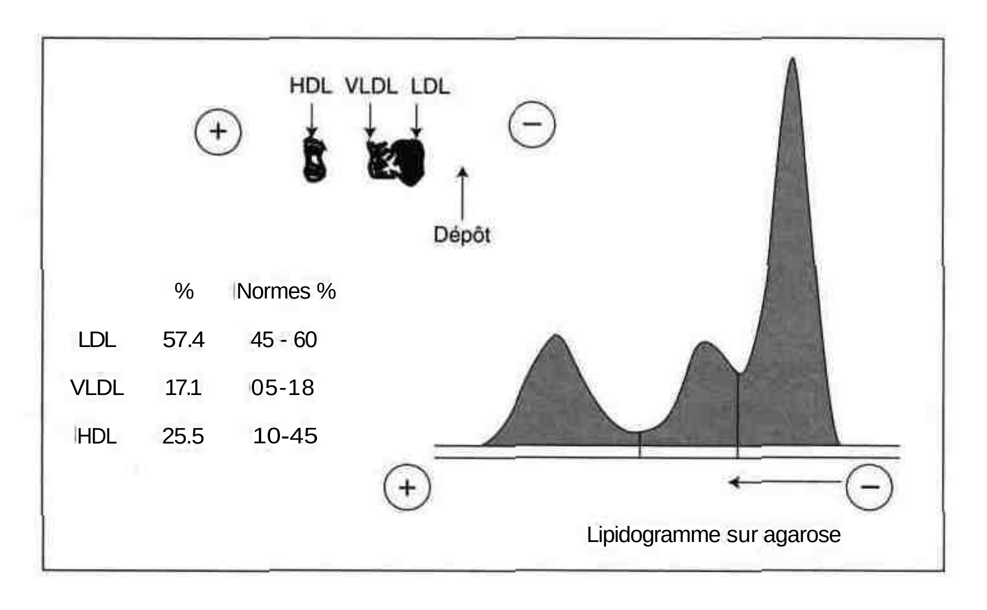
Ce dosage est également effectué selon les techniques classiques immunologiques. Il faut éviter la congélation des sémms pour les techniques utilisant les principes d'immunonéphélémétrie et d'immunoturbidimétrie.

Taux normaux < **0,3** g/1.

3.3.11. Électrophorèse des lipoprotéines

C'est un examen de deuxième intention qui apporte des informations complémentaires dans les cas de sérums troubles avec hypertriglycéridémie ou hyperlipémie mixte. Il permet un typage plus précis de ces hyperlipoprotéinémies.

Cet examen est pratiqué sur **agarose** ou sur **gel de polyacrylamide.**



	%	Normes %
LDL	57.4	45 - 60
VLDL	17.1	05-18
HDL	25.5	10-45

Figure 7.5 • Schéma d'un lipoprotéinogramme.

Après migration électrophorétique des lipoprotéines et coloration, il permet de visualiser qualitativement :

- une surcharge en chylomicrons au point de dépôt,
- une augmentation des VLDL et/ou des LDL,
- la présence d'IDL ou de Lp(a),
- une diminution relative des HDL.

Il faut le pratiquer sur sérum frais et ne pas l'utiliser pour quantifier le cholestérol HDL.

4. Principales dyslipoprotéinémies

Deux classifications, établies par Fredrickson et de Germes, peuvent être utilisées pour définir les dyslipoprotéinémies, (tableau 7.4).

Tableau 7.4 • Classifications des hyperiipoprotéinémies familiales.

Classification internationale (Fredrickson)	Fréquence	Aspect du sérum	CT	TG	Classification selon de Gennes
1 na	fréquent	clair	+++	N	*Hypercholestérolémies essentielles* 1) Forme mineure : expression biologique permanente, manifestations cardiovasculaires occasionnelles 2) Forme majeure : xanthomatose tendineuse hypercholestérolémique familiale (XTHF) 3) Forme monstrueuse de XTHF
IIb	fréquent	opalescent	++	+	*Hyperlipidémies mixtes* 1) Forme mineure : expression biologique permanente, quelques manifestations cardiovasculaires 2) Forme majeure avec ou sans xanthomatose
m	rare	opalescent	++	++	
i	très rare	lactescent	N ou +	+++	*Hypertnglycéridémies majeures* Formes exogènes dépendantes des graisses (activité lipoprotéine lipase diminuée)
IV	fréquent	opalescent	N ou +	++	Formes endogènes indépendantes des graisses soit glucide-dépendantes, soit éthanolo-dépendantes, soit association avec d'autres facteurs (pléthore, goutte...) activité lipoprotéine lipase normale
V	rare	lactescent	N ou +	+++	Forme exogènes et endogènes

1.1. Hyperiipoprotéinémies familiales

Trois hyperiipoprotéinémies représentent 99 % des cas : l'hypercholestérolémie essentielle (type lia de Fredrickson), l'hyperlipémie mixte type IIb et l'hy-)ertriglycéridémie de type IV.

4.1.1. Hypercholestérolémies essentielles

Elles atteignent 0,2 % de la population générale.

L'anomalie primitive porte principalement sur le gène codant le récepteur apo B/E des LDL avec plusieurs types de mutations entraînant des modifications sur différents domaines du récepteur.

Exemples :

- récepteur synthétisé mais non fixé sur la membrane plasmique ;
- pas de fixation possible de LDL ;
- fixation de LDL mais pas d'intemalisation ;
- il peut aussi y avoir des mutations sur le gène de l'apo B au niveau de son site de fixation sur le récepteur.

Dans tous les cas, les LDL ne sont pas captées par les cellules. Ces sujets type lia n'ont alors pas de récepteurs ou ont des récepteurs apo B déficients.

Il y a trois degrés d'atteintes :

- *une forme hétérozygote mineure* avec un cholestérol total < 4 g/1 ou 10 mmoVl ;
- *une forme hétérozygote avec xanthomes* (accumulation de cholestérol **au** niveau des tendons) le cholestérol total est de 4 à 6 g/1 ou de 10 à 15 mmol/1 ;
- *une forme homozygote avec xanthomes et cholestérol > 6 g/l ou 15 mmol/l.*

L'aspect du sérum est clair. Le cholestérol total, le cholestérol LDL et l'apo B sont augmentés. Le cholestérol HDL est normal ou diminué. Les triglycérides sont normaux.

Le pronostic vasculaire est très mauvais avec une augmentation des LDL circulantes qui peuvent être modifiées par oxydation ou acétylation ce qui augmente les charges négatives de la lipoprotéine. Le catabolisme de ces LDL chez ces sujets se fait par l'intermédiaire des récepteurs macrophagiques (récepteurs « scavenger ») qui ne sont pas régulés par le taux de cholestérol. Le macrophage pourra absorber un excès de LDL modifiées qui le transformera en cellule spumeuse. Le risque athérogène sera donc très important.

Les LDL présentes à des concentrations élevées peuvent aussi être captées par fixation et intemalisation « récepteur indépendante » par micropinocytose ; cet autre procédé en l'absence de récepteurs apo B-E permet de fournir du cholestérol aux tissus mais il n'y a plus aucune régulation de l'intemalisation et du métabolisme intracellulaire du cholestérol.

4.1.2. Hyperlipémies mixtes

Elles concernent 2 à 3 % de la population.

La nature des anomalies génétiques est encore inconnue. Il y a une augmentation de la synthèse de l'apo B et des VLDL, donc une augmentation des LDL.

Un vrai type IIb présente une augmentation du cholestérol et des triglycérides, mais sous l'influence des conditions diététiques on peut observer un cholestérol

élevé avec des triglycérides normaux (pseudo type lia) ou un cholestérol normal avec des triglycérides élevés (pseudo type IV).

L'aspect du sérum est plus ou moins opalescent.

Le cholestérol total, le cholestérol des LDL, les triglycérides totaux, les triglycérides des VLDL, l'apo B sont augmentés.

Cholestérol des HDL et apo AI sont généralement diminués.

Le risque athérogène est important.

4.1.3. Hypertriglycéridémies familiales

Elles représentent 1 % de la population. L'hypertriglycéridémie d'origine endogène est due à une augmentation de la synthèse hépatique des VLDL et à un ralentissement de leur catabolisme. L'apo CIII inhibitrice de la LPL peut être augmentée.

Le sérum est opalescent, le cholestérol est normal ou légèrement augmenté, les triglycérides sont très élevés et surtout les triglycérides des VLDL.

Le cholestérol HDL et l'apo AI sont diminués. Le risque athérogène est important.

L'hyperinsulinémie souvent associée suggère la participation d'un phénomène de résistance à l'insuline dans le développement de l'hypertriglycéridémie. Cette hypertriglycéridémie peut être intensifiée par des facteurs diététiques comme glucides, alcool, obésité.

Il faut éliminer toutes les causes secondaires d'hypertriglycéridémie avant de conclure à un type IV familial.

4.1.4. Autres hyperlipoprotéinémies familiales

Ces trois autres types (III, 1 et V) de la classification de Fredrickson sont beaucoup plus rares :

> DYSBÉTALIPOPROTÉINÉMIE DE TYPE III

Les lipoprotéines intermédiaires, IDL et les « remnants » de chylomicrons, ne sont pas épurés par la lipase hépatique car les sites récepteurs hépatiques à apo E (génotypes E2, E3, E4) ne reconnaissent pas le phénotype E2/E2. Les sujets atteints sont soit homozygotes E2/E2 soit hétérozygotes E2/E3 mais seulement 1 % des sujets portant l'allèle E2 développent un type III ; donc cette anomalie n'est pas suffisante pour le développement systématique de cette dyslipoprotéinémie. Le phénotype E3/E3 est le plus fréquent chez l'homme mais chez les sujets atteints par la maladie d'Alzheimer la fréquence des phénotypes avec apo E4 atteint 50 %.

La présence d'apo E4 serait un facteur de risque de développement de la maladie alors que l'apo E2 pourrait avoir un effet protecteur.

L'accumulation d'IDL et de VLDL se traduit par un catabolisme différent

de ces lipoprotéines : la voie macrophagique génératrice d'athérome comme dans le type lia est utilisée. **Le risque cardiovasculaire est élevé.**

► HYPERCHYLOMICRONÉMIE (TYPE I)

Très rare, elle est caractérisée par une **forte hypertriglycéridémie** d'origine exogène avec accumulation de chylomicrons. Elle est donc dépendante de l'apport en graisses alimentaires.

Le défaut génétique porte soit sur la lipoprotéine lipase, soit sur son activateur l'apo Cil. L'enzyme est donc soit absente, soit inactive et les chylomicrons ne sont plus dégradés. Dans certains cas il peut y avoir aussi accumulation de VLDL (type V).

La principale complication est **la pancréatite aiguë** mais le type 1 n'est pas athérogène.

► HYPERTRIGLYCÉRIDÉMIE MIXTE EXOGÈNE ET ENDOGÈNE (TYPE V)

C'est une hypertriglycéridémie due à l'augmentation des chylomicrons et des VLDL c'est-à-dire une combinaison des types 1 et IV. Le mode de transmission n'est pas déterminé. L'hypertriglycéridémie peut être aggravée par une forte consommation de glucides, alcool et graisses.

Des dyslipoprotéinémies rares ne sont pas classées selon les types de Fredrickson. On peut cependant en citer quatre.

► HYPERAPOBÉTALIPOPROTÉINÉMIE

Identifiée par Sniderman, elle est caractérisée par une augmentation de l'apo B avec un cholestérol LDL normal ou légèrement élevé. Les LDL sont plus petites, denses et très athèrogènes.

> AUGMENTATION DE LA LP(a)

Le taux de Lp(a) est supérieur à 0,3 g/1. Cette lipoprotéine est alors visible à l'électrophorèse sur agarose ou en gel de polyacrylamide. Elle est associée ou non à une hyperlipémie. Le risque athérogène est très élevé.

>• HYPERALPHALIPOPROTÉINÉMIE

Ces sujets présentent une augmentation du cholestérol HDL avec un cholestérol LDL normal.

La transmission génétique est autosomique dominante. Les familles atteintes ont une grande longévité et une bonne protection contre l'athérosclérose.

► HYPOALPHALIPOPROTÉINÉMIE FAMILIALE

Le cholestérol HDL est diminué ainsi que l'apo AI. Il existe des analphalipoprotéinémies qui relèvent d'un défaut de synthèse des apo AI ou des apo AI et apo Cil car les deux gènes sont voisins.

1
r La maladie de Tangier est une analphalipoprotéinémie autosomique récessive avec mutation sur le gène de l'apo AI. Le transport « reverse » du cholestérol n'est plus effectué et il se dépose dans différents tissus.

Des hypolipoprotéinémies peuvent être rencontrées au cours de maladies de la nutrition et de la maladie cœliaque.

1 Les végétariens ont un taux de lipoprotéines et de cholestérol plus bas que les omnivores.



2. Dyslipoprotéinémies secondaires

Une dyslipoprotéinémie secondaire peut être iatrogène ou bien être la conséquence de nombreuses pathologies et modifications hormonales. Elle est susceptible de régresser par le seul traitement de l'affection causale. Les plus fréquentes sont présentées dans le tableau 7.5.

4.2.1. Pathologies métaboliques et hyperlipoprotéinémies secondaires

> DIABÈTE SUCRÉ

L'hyperlipoprotéinémie de type IV est la plus fréquemment associée au diabète mais sont également trouvés les types IIb et V. L'activité LPL est diminuée car l'insuline est diminuée. La lipolyse intra-adipocytaire n'est plus freinée par l'insuline et entraîne une activation de la synthèse des VLDL.

Tableau 7.5 • Principales dyslipoprotémémies secondaires.

Pathologie métabolique	Types selon Fredrickson	CT	TG
Diabète (type 1 ou II)	IV ou IIb	N ou +	+
Insuffisance rénale	IV ou IIb	N ou +	+
Hyperuricémie	IV ou IIb	N ou +	+
Syndrome néphrotique	IIb ou IV	+	+
Pathologie Hormonale			
Hypothyroïde	lia ou IIb	++	NOU++
Hyperlipoprotéinémies iatrogènes			
Usage de contraceptifs stéroïdiens	nb,iv	N ou +	+
Béta-Bloquants	IV	N	+
Diurétiques thiazidiques	nb	+	+
Corticoïdes	IV ou IIb	N ou +	+

▶ OBÉSITÉ

Le type IV est le plus fréquent, provoqué par une augmentation de la synthèse des VLDL.

L'association clinicobiologique de l'obésité, hypertension, insulinorésistance avec hyperinsulinisme secondaire est dénommée « syndrome X » : chez ces sujets il y a une augmentation des VLDL due à l'insulinorésistance. Le cholestérol HDL est souvent diminué et le risque cardiovasculaire est très augmenté chez ces sujets.

▶ HYPERURICÉMIE

Le type IV et le type IIb sont fréquemment associés à l'hyperuricémie et à la goutte.

▶ CHOLESTASE INTRA- OU EXTRAHÉPATIQUE

Les types lia et IIb sont rencontrés. Le foie sécrète dans le sang des lipoprotéines anormales dites lipoprotéines X riches en cholestérol libre, phospholipides et en apo C et E. L'activité LCAT serait diminuée par la présence de sels biliaires dans le sang.

>• INSUFFISANCE RÉNALE **CHRONIQUE**

Le type IV est surtout présent avec une augmentation de la synthèse des VLDL et un catabolisme freiné par une augmentation de l'apo CIII, inhibitrice de la LPL et peut-être par un déficit en lipase hépatique.

Les sujets en hémodialyse présentent les mêmes perturbations alors que les sujets transplantés sous corticothérapie évoluent vers un type IIb.

▶ SYNDROME NÉPHROTIQUE

Les types IIb et IV sont principalement rencontrés. La fuite de l'albumine au niveau rénal provoque un excès d'acides gras libres par rapport à la sérum-albumine qui les transporte et entraîne une stimulation de la synthèse des VLDL et un catabolisme diminué. La synthèse de l'apo B est également augmentée. De plus la lipase hépatique serait moins active.

4.2.2. Pathologies hormonales

> HYPOTHYROÏDIE

Elle est fréquemment associée à des types lia et IIb. Le mécanisme est mal élucidé. Il semble qu'une faible concentration en hormones thyroïdiennes entraîne une diminution du catabolisme des LDL et du cholestérol.

> HYPERTHYROÏDŒ

Elle est généralement associée à une hypocholestérolémie.

4.2.3. Hyperlipoprotéinémies iatrogènes

Différents troubles lipidiques peuvent être provoqués par la prise de médicaments. Les plus importants sont :

> TRAITEMENT AVEC CONTRACEPTIFS STÉROÏDIENS

1 Les œstrogènes diminuent l'activité lipase hépatique donc provoquent une hypertriglycéridémie et une augmentation des HDL2.

Les progestatifs norstéroïdes augmentent l'activité lipase hépatique donc diminuent les triglycérides et les HDL2.

Les progestatifs non androgéniques n'ont pas d'influence.

> AU COURS DU TRAITEMENT DE L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE

Certains (3-bloquants peuvent diminuer l'activité **LPL** entraînant une hypertriglycéridémie.

Les diurétiques thiazidiques provoquent une augmentation du cholestérol, surtout du cholestérol LDL, et une augmentation des triglycérides.

▶ AU COURS DES CORTICOTHÉRAPIES DE LONGUE DURÉE.

Elles peuvent provoquer l'installation de types IIb ou IV.

4.3. Notions thérapeutiques

Dans toutes les dyslipoprotéinémies athérogènes, le régime est appliqué systématiquement et constitue la première mesure thérapeutique. L'indication d'un médicament sera discutée dans un deuxième temps après trois à six mois de régime. Les seuils décisionnels de traitement sont présentés dans le tableau 7.6 I selon les références médicales opposables (RMO).

4.3.1. Traitement diététique

> EN CAS D'HYPERCHOLESTÉROLÉMIE

r D ne faut pas dépasser un apport quotidien en cholestérol de 300 mg. **Les** graisses **d'origine animale sont à proscrire** : jaune d'œuf, beurre, charcuterie...

Il faut diminuer la consommation en graisses saturées en évitant les graisses d'origine animale mais aussi certaines graisses végétales, huile de coco, végétaline, huile de palme, beurre de cacao, margarines dures...

Il faut augmenter les graisses insaturées : acides gras monoinsaturés (acide oléique) et polyinsaturés. Les huiles végétales (tournesol, maïs, colza, soja, noix, pépin de raisin) et les margarines dérivées de ces huiles sont à utiliser ; l'huile d'olive est riche en acide oléique mono-insaturé. Les poissons, même les poissons gras comme saumon, sardine... sont une source importante d'acides gras polyinsaturés.

Tableau 7.6 • Seuils décisionnels de traitement.

Catégorie de patients ayant une élévation duLDL Cholestérol	Valeur d'instauration du traitement diététique	Valeur cible	Valeur d'instauration du traitement médicamenteux	Valeur cible
Prévention primaire des hommes de moins de 45 ans ou femmes non ménopausées n'ayant aucun autre facteur de risque	>2,20g/l (5,7 mmol/1) ++	<1,60 (4,1)	Pas d'indication en première intention	
Prévention primaire des hommes de moins de 45 ans ou femmes non ménopausées n'ayant aucun autre facteur de risque après échec de la diététique.			>2,20 (5,7) malgré une diététique suivie pendant 6 mois	<1,60 (4,1)
Prévention primaire des sujets ayant un autre facteur de risque	≥ 1,60 (4,1)	<1,60 (4,1)	21,90 (4.9)	<1,60 (4,1)
Prévention primaire des sujets ayant au moins deux autres facteurs de risque	>1,30 (3,4)	<1,30 (3.4)	<1,60 (4,1)	<1,30 (3,4)
Prévention secondaire des sujets ayant une maladie coronaire patente.	>1,30 (3,4)	<1,00 (2.6)	>1,30 (3,4) malgré une diététique suivie pendant 3 mois	<1,00 (2,6)

Dans le cadre de la prévention des maladies cardiovasculaires, il faut préférer les glucides complexes et riches en fibres (pain complet, pain, légumes verts et secs, fruits, pommes de terre, pâtes, riz) aux sucres d'absorption rapide (sucre, confitures, confiseries, jus de fruis sucrés...).

> ENCASD'HYPERTRIGLYCÉRIDÉMffi

II faut réduire les glucides et les boissons alcoolisées.

L'obésité est quelque fois liée à une augmentation des triglycérides et du cholestérol associée à une diminution du cholestérol HDL.

Dans ce cas il faut diminuer l'apport calorique (en particulier les graisses, les sucres d'absorption rapide et l'alcool) et en même temps **augmenter les dépenses énergétiques en pratiquant des exercices physiques.**

4.3.2. Traitements médicamenteux

i *4.3.2.1. Hypocholestérolémiants*

> RÉSINES SÉQUESTRANT LES ACIDES BILIAIRES

En France, c'est la *choiestyramine* (Questran®) qui est utilisée pour le type lia. Le cholestérol est alors consommé par les hépatocytes pour une production accrue d'acides biliaires. Cependant, il y a quelques effets digestifs secondaires.

> FIBRATES

Différents dérivés des fibrates : fénofibrate, bezafibrate, ciprofibrate sont utilisés dans les hyperlipémies mixtes mais aussi pour les hypercholestérolémies. Leurs actions s'exercent à plusieurs niveaux en particulier en activant les oxydations d'acides gras dans les peroxysomes. En effet ces molécules agiraient par l'intermédiaire de récepteurs d'activation des peroxysomes (PPARs a et "y) qui en leur présence migreraient vers le noyau entraînant la transcription et la traduction de protéines enzymatiques du peroxysome. Le PPAR a présent dans foie, rein, cœur et muscle serait un régulateur essentiel du métabolisme lipidique en augmentant l'expression du gène de la lipoprotéine lipase et en diminuant la synthèse de l'apo CIII. De plus une induction de la synthèse des apo AI et AU par le PPAR a permet d'augmenter le cholestérol HDL sous traitement par fibrates. La modulation par les PPARs a permet d'expliquer la diminution de la synthèse des VLDL et l'augmentation de leur catabolisme sous fibrates. Les fibrates sont particulièrement indiqués dans les hyperlipoprotéinémies mixtes avec augmentation du LDL cholestérol et des triglycérides, après échec du régime.

> INHIBITEURS DE LA P-HYDROXY, P-MÉTHYL, GLUTARYL-COA RÉDUCTASE

Cette enzyme (HMG CoA réductase) régulatrice de la synthèse intracellulaire du cholestérol peut être inhibée par des « statines ». La concentration intracellulaire de cholestérol diminue, il y a alors stimulation de la synthèse des récepteurs à LDL et captation augmentée des LDL.

Différentes statines sont commercialisées : pravastatine, simvastatine, fluvastatine, cérivastatine et atorvastatine. Leur effet biologique majeur est d'abaisser le LDL cholestérol. Les statines sont utilisées principalement dans les hypercholestérolémies type lia.

4.3.2.2. Autres hypolipémiants

> ACIDE NICOTINIQUE

II est peu utilisé en France. Il diminuerait le taux de Lp(a).

▶ PROBUCOL (LURSELLE®)

Ancien hypocholestérolémiant, il diminue le cholestérol LDL mais aussi le cholestérol HDL. Cependant il est efficace dans la régression des xanthomes. Il est surtout un anti-oxydant ; or la peroxydation des LDL joue un rôle important dans l'athérogénèse. Donc ce médicament, comme la vitamine E, serait protecteur de l'athérome par ses propriétés anti-oxydantes.

▶ ACIDES GRAS POLYINSATURÉS DE LA SÉRIE ω_3 (MAXEPA®)

Ces extraits d'huile de chair de poisson sont efficaces sur les hypertriglycéridémies de type IV et V. Ils diminuent la synthèse hépatique des triglycérides et augmentent le catabolisme des VLDL par activation de la lipoprotéine lipase. Ils ont également un effet anti-agrégant plaquettaire.

>• HUILES AVEC ACIDES GRAS À CHAÎNES COURTES

Elles sont utilisées dans les régimes des hypertriglycéridémies exogènes car ces acides gras à chaîne courtes sont libérés directement par l'entérocyte sans entraîner la synthèse des chylomicrons.

5. *Conclusion*

En épidémiologie, pour diminuer la mortalité cardiovasculaire, deux causes majeures devraient pouvoir être évitées : **le tabagisme et l'hypercholestérolémie.** Pour celle-ci, il faut un dépistage systématique des hyperlipémies, associé à une modification du régime alimentaire général. Ce dernier devrait comprendre 30 % seulement de la ration sous forme de graisses, elles mêmes représentées à parties égales de graisses saturées, mono-insaturées et polyinsaturées.

Références bibliographiques

Bilan lipidique en pratique médicale courante. *Biologiste et praticien,* Mendiboume, Paris, 1990,4.

Lipoprotein analysis. C.A. *Converse and E.R. Skinner*. Oxford University Press, London (1992).

Hyperlipidémies ; G. *Turpin et al.* Arcol John Libbey. Montrouge, France (1995).

Biochimie pour le clinicien. *J.P. Borel*. Frison Roche, Paris (1999).

8

Généralités sur le métabolisme awté

Pierre Valdiguié

Les protides (du grec protos, premier) sont les constituants principaux de la cellule sur le plan plastique aussi bien que dynamique. Ils sont formés par l'enchaînement d'aminoacides et renferment environ 16 % d'azote, appartenant au radical aminé de ces aminoacides.

Le métabolisme azoté est donc le plus important de tous les métabolismes des constituants organiques de la matière vivante et il mérite quelques notions générales introductives de physiologie et de biochimie.

1. Besoins et apports protéiques

Les besoins sont à la fois quantitatifs et qualitatifs. Ils doivent être pris **en** compte dans toute étude nutritionnelle.

1.1. Besoins quantitatifs

Malheureusement trop souvent objectivés par les médias lors des reportages sur les pays du tiers monde ou lors des grandes famines, les apports protéiques sont, dans ces cas, insuffisants. Pourtant le **besoin minimum, chez l'adulte, en protéines alimentaires est faible, environ 1 à 1,1 g par kilo de poids corporel.**

Facilement couvert dans les pays riches, ce besoin est satisfait par une alimentation mixte et équilibrée. Les protéines végétales des céréales, telles que les glutélines, et les protéines de l'alimentation camée et lactée apportent même souvent un large excédent qui sera perdu sous forme d'urée urinaire.

Les 20 acides aminés courants des protéines sont ainsi apportés. La liste des aminoacides non indispensables comprend **glycocolle, alanine, serine, cystéine, acide aspartique, asparagine, acide glutamique, glutamine, proline et tyrosine.** Les aminoacides indispensables sont présentés ci-après.

1.2. Besoins qualitatifs

Ils sont représentés par les aminoacides indispensables et les vitamines.

1.2.1. Aminoacides indispensables

Ils sont au nombre de :

- *8 chez l'adulte :* **valine, thréonine, leucine, isoleucine, méthionine, lysine, phénylalanine et tryptophane ;**
- *10 pendant la période de croissance* car **histidine** et **arginine** s'ajoutent à la liste précédente, n'étant fabriquées qu'en quantité insuffisante par nos cellules (arginine) ou par la flore bactérienne intestinale (histidine) d'où nous l'obtenons par symbiose.

Ces acides aminés sont facilement apportés par les protéines animales de l'alimentation camée ou lactée, alors que *les protéines de certaines céréales renferment peu de tryptophane et de lysine.*

Dès lors, dans les pays où la ration alimentaire dépend largement des farines de ces céréales, et dans la mesure où il n'y a pas de supplémentation par des protéines d'origine animale, de graves états de déficience sont observés, de type kwashiorkor ou marasme, associant un déficit quantitatif à une insuffisance en aminoacides indispensables et en vitamines.

1.2.2. Vitamines

Le terme de vitamine désignait *toute substance azotée indispensable à la vie* car non synthétisée par nos cellules et devant dès lors être apportée par l'alimentation.

En réalité on sait maintenant que de nombreuses vitamines sont dépourvues d'azote (acide ascorbique ou vitamine C par exemple) et que des substances encore appelées vitamines sont en fait synthétisables par nos cellules, bien que parfois en quantité insuffisante (amide nicotinique ou vitamine PP par exemple, fabriquée en réalité à partir de métabolites du tryptophane).

Les progrès de la diététique, les connaissances sur nos besoins nutritionnels sont maintenant parvenus à bien cerner le besoin vitaminique.

Rappelons qu'il nécessite des vitamines dites liposolubles (vitamines A, D, E et K) et des vitamines hydrosolubles très nombreuses (B_1, B_2, B_6, H, Bc, B_{12}, etc.).

2. *Digestion et absorption intestinale*

2.1. Digestion des protéines alimentaires

La protéolyse digestive est réalisée par des enzymes gastrique, pancréatiques et intestinales.

On distingue des exopeptidases et des endopeptidases.

- Les endopeptidases hydrolysent les liaisons peptidiques des protéines à l'intérieur des chaînes. Les principales endopeptidases sont :

- *la pepsine gastrique ;*
- *la trypsine ;*

gi - *la chymotrypsine pancréatiques.*

Ces enzymes sont sécrétées sous forme de *proenzymes inactives* puis activées dans l'intestin par des mécanismes divers (entérokinase, autocatalyse protéolytique, activation par la trypsine). L'activation in situ au niveau du pancréas est responsable de lésions graves comme celles de la pancréatite aiguë hémorragique.

Leur spécificité d'action est différente. La plus étroite est celle de la trypsine qui hydrolyse spécifiquement les liaisons peptidiques dans lesquelles sont engagés les COOH de l'arginine et de la lysine.

Le résultat de la protéolyse par les endopeptidases est un mélange très complexe de peptides sur lesquels agiront les exopeptidases.

- Les exopeptidases principales sont :

- l'aminopeptidase qui libère l'acide aminé situé en position N terminale,
- la carboxypeptidase qui détache en revanche l'aminoacide du côté opposé c'est-à-dire COOH terminal.

Ces deux enzymes ont une action récurrente, permettant l'hydrolyse complète de la plupart des peptides. Ainsi le résultat final de la protéolyse est un mélange des vingt aminoacides courants des protéines et de quelques dipeptides non encore totalement hydrolyses.

2.2. Absorption intestinale des acides aminés

Le mélange d'aminoacides et de dipeptides subit un *transport membranaire actif au* niveau de la bordure en brosse, couplé à l'absorption du Na^{+}. Ce dernier sera chassé ultérieurement par le canal Na-K avec consommation d'énergie. Les quelques dipeptides absorbés subissent une hydrolyse intracellulaire.

Normalement tous les acides aminés sont absorbés avant la valvule iléocaecale et les composés azotés présents dans le côlon proviennent du mucus, des sécrétions, des leucocytes et des cellules épithéliales desquamées. Leurs transformations sont effectuées par la flore bactérienne colique au cours de la putréfaction.

La dégradation incomplète du gluten, principale protéine du blé, est responsable, chez certains enfants, de l'absorption puis du passage dans le sang de polypeptides qui entraînent l'apparition d'anticorps, créant des lésions de la muqueuse intestinale (atrophie villositaire), des troubles de l'absorption avec une diarrhée particulière (selles « bouseuses »), puis des troubles généraux, un arrêt de la croissance pondérale, le tout caractéristique de la **maladie cœliaque.** Le traitement est préventif, par la suppression des farines de céréales de l'alimentation de l'enfant.

La maladie cœliaque est aussi observée chez l'adulte. Le syndrome de malabsorption et la diarrhée s'accompagnent volontiers d'ostéomalacie ou d'anémie de carence.

3. *Utilisation métabolique*

Après leur absorption dans l'intestin grêle, les aminoacides gagnent le foie par la voie portale où ils retrouvent une partie des acides aminés issus de la destruction physiologique des tissus sous l'action de cathepsines.

Leur destinée métabolique est alors variable. Certains servent à *l'édification de protéines* nouvelles, d'autres sont utilisés pour faire du *glucose* et la fonction aminée doit être détachée par désamination ou transamination. *L'ammoniac* qui en résulte aura son métabolisme propre (cf. chapitre 11 Constituants azotés non protéiques).

3.1. Biosynthèses protéiques

Le foie et tous les autres tissus utilisent *le pool des aminoacides* pour édifier leurs protéines.

Ce pool est obtenu à partir des aminoacides alimentaires, des aminoacides issus du renouvellement permanent des protéines tissulaires et aussi des aminoacides non indispensables fabriqués à partir de divers matériaux dont le glucose.

Ainsi le foie est-il impliqué dans la genèse des très nombreuses protéines plasmatiques (toutes à l'exception des immunoglobulines).

Les opérations de biosynthèse obéissent aux règles classiques de la **synthèse des protéines,** à savoir transcription des gènes de structure de l'ADN sous forme d'ARN messagers, traduction du message nucléotidique en terme d'acides aminés grâce aux ribosomes et aux ARN de transfert positionnant l'aminoacide voulu à la place requise.

Cette synthèse des séquences primaires des protéines sera suivie par la glycosylation et la maturation des protéines dans l'appareil de Golgi, aboutissant aux structures secondaire puis tertiaire voire quaternaire des protéines.

3.2. Néoglucogénèse

L'utilisation de la chaîne carbonée des aminoacides pour faire du glucose est très classique et essentielle. Tous les aminoacides sont en effet glucoformateurs, à l'exception de la leucine, cétoformatrice stricte. C'est la néoglucogénèse, principalement hépatique, stimulée par le cortisol et inhibée par l'insuline.

4. *Catabolisme et élimination azotée*

L'adulte sain soumis à un régime normal est en **équilibre azoté** c'est-à-dire que les *apports* d'azote alimentaire, sous forme presque exclusivement de protéines alimentaires, (de 60 à 90 g par jour soit 10 à 12 g d'azote) et *l'excrétion totale* d'azote sont identiques.

Quelles sont la nature, l'origine et le mécanisme biochimique de l'excrétion otée ?

•Ll. Excrétion azotée

Elle est faite de diverses composantes :

- *l'excrétion fécale* est relativement constante mais elle est faible : environ 1 à 2 g par jour. Elle s'élève lors des syndromes de malabsorption de la maladie , coeliaque ou lors des insuffisances pancréatiques chroniques.

| Elle s'abaisse au cours du jeûne.

- *la déperdition azotée* est minime par la desquamation cutanée, la coupe des cheveux et des ongles et la sueur.
- *l'élimination urinaire* est prépondérante. On y trouve en effet **l'azote uréique** qui représente 50 % de l'azote total urinaire, des traces de protéines, des aminoacides, de la créatinine, des sels ammoniacaux, de l'acide urique.

Comprendre l'importance de l'élimination de l'urée, terme du métabolisme du radical NH_2 des acides aminés est donc fondamental.

4.2. Origine de l'élimination azotée sous forme uréique

Elle est double, associant le catabolisme des aminoacides alimentaires en x excès » et celui des aminoacides issus de la dégradation endogène des protéines.

Le processus général devant respecter l'équilibre entre entrées et sorties, deux kthéories se sont, un temps, affrontées.

4.2.1. *Théorie de l'usure et de la dégradation*

L'excès d'acides aminés alimentaires est immédiatement éliminé sous forme d'urée et représente la **part exogène de l'élimination.**

La part endogène correspond à la fraction détruite des protéines « usées » par les cathepsines cellulaires.

Cette théorie est restée longtemps classique. Elle n'est plus en fait maintenant applicable que dans un cas bien particulier, celui de **l'hémoglobine** qui, enfermée dans son sac globulaire, échappe au renouvellement permanent et est détruite au bout d'environ 120 jours lorsque l'érythrocyte arrive au terme de sa vie.

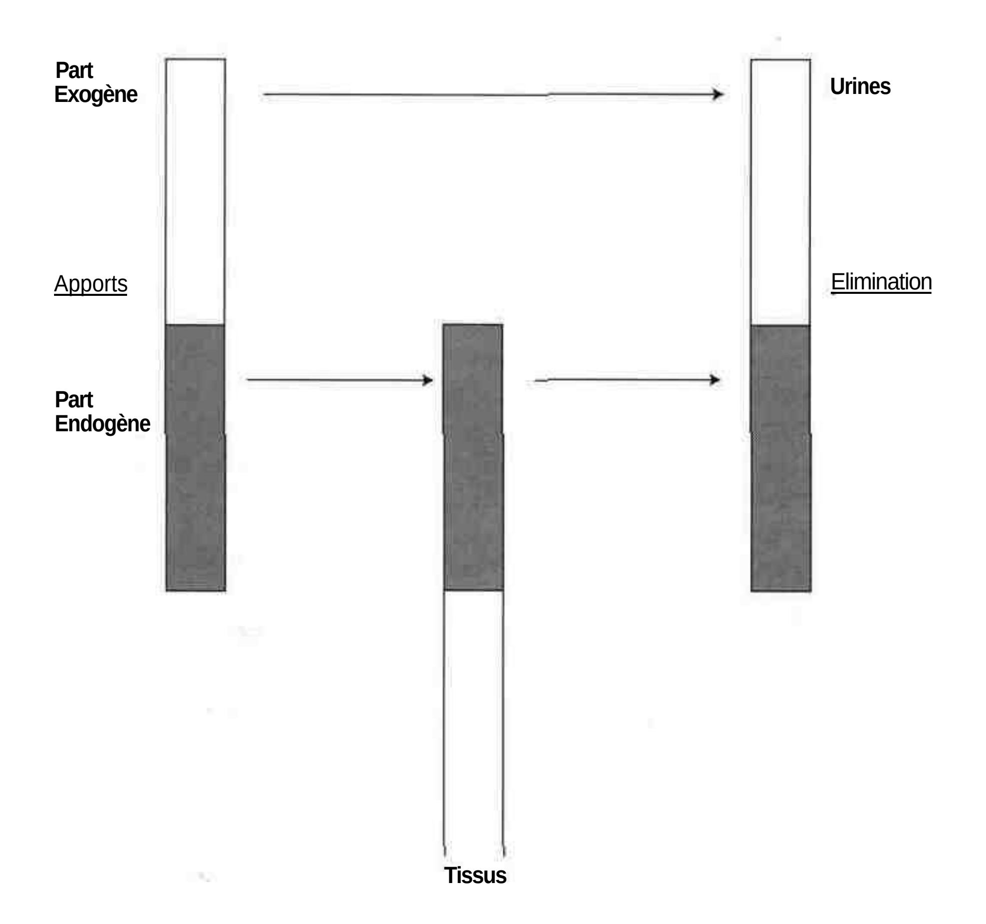


Figure 8.1 • Représentation schématique du métabolisme azoté dans la théorie de « l'usure et de la dégradation ».

4.2.2. *Théorie du métabolisme azoté permanent*

Le renouvellement permanent des protéines implique qu'il y ait une scission continue des protéines plasmatiques ou cellulaires, même s'il y a un excédent d'apport protéique alimentaire.

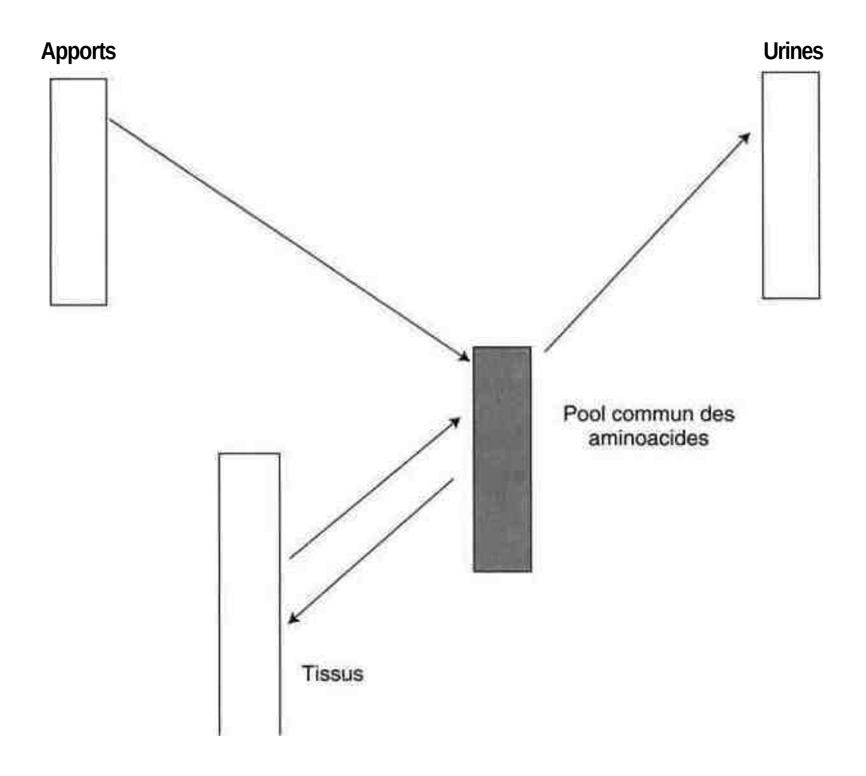


Figure 8.2 • Théorie du renouvellement permanent.

L'hydrolyse et **le** renouvellement continus ne correspondent pas, bien entendu, à une usure des molécules mais à une destruction permanente suivie de reconstruction.

Selon ce mécanisme, la fraction éliminée est issue du pool des aminoacides, fond commun à partir duquel s'effectuent aussi bien les synthèses que les catabolismes.

Toutes les protéines de l'organisme répondent à ce schéma à l'exception de l'hémoglobine, comme déjà indiqué ci-dessus.

Toutefois ce pool d''aminoacides ne représente pas une réserve. **Il n'y a pas, chez l'adulte, de mise en réserve d'azote,** à la différence des réserves glucidiques (glycogène) ou surtout lipidiques (triglycérides du tissu adipeux).

Un bilan azoté positif sera noté seulement au cours de la croissance du sujet jeune et chez la femme au cours de la grossesse, alors *qu'un bilan négatif* sera observé quand les pertes dépasseront les apports, en particulier lors du jeûne, des syndromes de malabsorption, des hypercatabolismes protéiques (fièvre, infection, traumatismes, brûlures étendues).

4.3. Catabolisme du radical aminé des aminoacides

Le mécanisme biochimique de la **production d'urée** procède de deux éléments :

- *la désamination des aminoacides,* directe ou indirecte au travers de la transamination avec formation d'ammoniac.
- l'intégration de cet ammoniac dans la molécule d'urée par les réactions hépatiques de *l'uréogénèse* (cf. chapitre 11).

4.3.1. Désamination des acides aminés

Tous les aminoacides sont concernés, la libération d'ammoniac laissant la chaîne carbonée disponible pour la néoglucogénèse.

▶ DÉSAMINATION OXYDATIVE

Elle concerne théoriquement tous les aminoacides grâce à l'enzyme très générale qu'est la L-aminoacide déshydrogénase. En réalité cette enzyme est peu active et la désamination oxydative s'applique donc essentiellement à l'acide glutamique, activement désaminé par sa déshydrogénase spécifique (L-**glutamodéshydrogénase)** qui le transforme en acide a céto-glutarique.

Celui-ci est aussi impliqué dans les réactions de **transamination** qui permettent à tous les autres aminoacides de lui céder leur groupement aminé, ce qui le transforme en acide glutamique, alors facilement désaminé.

Dès lors *directement* mais surtout *indirectement* au travers de la transamination, tous les acides aminés peuvent libérer leur radical NH_2, qui est ensuite transformé en NH_3, dissimulé sous forme de glutamine.

▶ AUTRES TYPES DE DÉSAMINATION

II s'agit de processus biochimiques particuliers pour divers aminoacides :

- désamination déshydratante pour les aminoacides hydroxylés *serine* et *thréonine ;*
- désamination désulfurante pour *cystéine* et homocystéine issue de la *méthionine ;*
- désamination désaturante pour *l'histidine.*

Le résultat est partout identique, car l'ammoniac libéré est immédiatement détoxiqué sous forme de glutamine, agent de transport et d'utilisation de l'ammoniac, à côté de son rôle plastique de constituant des protéines (car c'est un des 20 aminoacides des protéines).

4.3.2. Uréogénèse hépatique

Le cycle de l'uréogénèse est destiné à intégrer sous forme d'urée **deux molécules d'ammoniac** (apportées par la glutamine et libérées par la glutaminase) et **une molécule de gaz carbonique.**

Le processus métabolique, représenté sur la figure 11.1, fixe la première molécule d'ammoniac et le CO_2, sous forme de **carbamyl-phosphate** qui s'intégrera à **l'omithine** pour produire de la **citrulline.**

Celle-ci recevra une deuxième molécule d'ammoniac, en réalité apportée sous forme **d'acide aspartique,** pour former **l'arginine,** alors spécifiquement et très activement hydrolysée par *l'arginase hépatique* en **urée et ornithine,** prête à redémarrer le cycle.

5. Régulation hormonale

L'ensemble du métabolisme azoté est soumis à des facteurs de régulation soit favorables (anabolisants) soit défavorables (catabolisants).

5.1. Facteurs anabolisants

Ils favorisent, comme leur nom l'indique, la biosynthèse des protéines et tendent à entraîner un bilan azoté positif.

Ces facteurs sont très nombreux et l'on peut distinguer des facteurs hormoinaux et des facteurs de croissance.

5.1.1. Facteurs hormonaux

15.7.7.7. *Insuline*

Elle freine la néoglucogénèse et favorise la biosynthèse protéique en augmentant la production énergétique d'origine glucidique, en facilitant aussi l'incorporation directe des aminoacides dans les chaînes protéiques en cours d'édification sur les ribosomes.

5.1.1.2. Hormone de croissance

Elle stimule la biosynthèse des protéines, la croissance et le développement tissulaires, provoquant ainsi une rétention azotée et un bilan azoté positif.

p.1.1.3. Androgènes

Les hormones mâles sont très classiquement de puissants agents anabolisants.

Elles entraînent une stimulation générale de la biosynthèse des acides nucléiques et des protéines, exerçant en particulier une **action trophique très** nette **sur les muscles** squelettiques (utilisation sportive lors du dopage) et la matrice protéique de l'os (utilisation thérapeutique dans l'ostéoporose sénile).

Comme toutes les hormones androgènes, les produits de synthèse ou anabolisants ont toutefois conservé une part de **l'action virilisante,** ce qui est souvent gênant au cours des utilisations thérapeutiques chez la femme.

5.1.1.4. Œstrogènes

Leur action isolée est difficile à mettre en évidence puisque c'est surtout l'association œstroprogestative qui est impliquée dans le développement des cellules de la sphère génitale. Cependant la survenue de l'ostéoporose post-ménopausique montre bien l'influence favorable des œstrogènes sur la trophicité de la trame protéique de l'os.

5.2.2. *Facteurs de croissance et cytokines*

De connaissance récente, ces facteurs, reconnus par des récepteurs membranaires spécifiques, s'adressent au métabolisme cellulaire. Ils stimulent (ou parfois dépriment) le métabolisme protéique par le biais d'actions nucléaires déclenchant diverses réponses cellulaires ou diverses productions enzymatiques aboutissant finalement à une stimulation générale du métabolisme cellulaire.

Leur nombre s'accroît chaque jour grâce aux connaissances permises par les progrès du génie génétique, de même que leur mécanisme d'action se précise petit à petit.

Ainsi par exemple les cytokines du groupe des **interleukines** sont sécrétées par les mastocytes en réponse à la fixation d'IgE sur des récepteurs spécifiques de haute affinité ou bien à la suite d'une stimulation non immunologique induite par des ionophores pour le calcium. Les propriétés proinflammatoires de certaines de ces cytokines sont liées à la production de substances déclenchant l'inflammation, à l'induction de molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales, au chimiotactisme et peuvent déclencher une réaction de type allergique qui pourra, elle-même, être autoentretenue.

5.2. Facteurs catabolisants

5.2.1. Glucocorticoïdes

Cortisol, cortisone et cortisoniques de synthèse (corticoïdes) accélèrent le catabolisme protidique. Ils provoquent une fuite urinaire azotée, augmentent la néoglucogénèse et rendent donc la balance azotée négative.

De plus ils inhibent l'incorporation des aminoacides dans les chaînes en cours de biosynthèse.

Leur action est particulièrement nette au niveau de la peau, très amincie, au niveau de l'os avec ostéoporose grave, ou au niveau des muscles avec atrophie, lors des **hypercorticismes** ou des syndromes de Cushing iatrogènes.

5.2.2. *Hormones thyroïdiennes*

Elles augmentent le catabolisme azoté comme elles stimulent tous les métabolismes. Ainsi l'amaigrissement est-il un des signes cardinaux de l'hyperthyroïdie.

9

Protéines plasmatiques

Pierre Valdiguié

Les protéines représentent la plus grande partie des matières solides du plasma. En dehors du fibrinogène, protéine fibreuse, ce sont toutes des protéines globulaires. Seule la sérum-albumine est une holoprotéine, toutes les autres étant des hétéroprotéines pouvant contenir des lipides (lipoprotéines), des métaux (métalloprotéines) et surtout des glucides, la plupart des protéines plasmatiques sont en effet des glycoprotéines.

Leurs propriétés sont très variables : transporteurs, anticorps, enzymes, agents de pression oncotique, marqueurs de l'inflammation, marqueurs tumoraux, agents de la coagulation, facteurs de croissance, **etc...** mais il faudra différencier les protéines toujours présentes dans le plasma, éléments constitutifs de celui-ci et celles, d'origine cellulaire, n'y apparaissant que transitoirement.

Principales protéines plasmatiques

A. Sérum-albumine

Représentant 55 à 60 % de l'ensemble des protéines du plasma, c'est **le** constituant majeur des protéines circulantes.

Son poids moléculaire est 69 000 Da. C'est une molécule relativement stable, contenant 564 amino-acides, répartis sur une seule chaîne peptidique. La fonction thiol libre d'une cystéine lui confère une réactivité particulière.

Elle est le principal agent de la pression oncotique et joue un rôle très important de transporteur : transport de bilirubine, d'acide gras, de médicaments, d'hormones thyroïdiennes

Elle est facile à doser par des méthodes colorimétriques, immunologiques **ou** par électrophorèse à condition de disposer de la protidémie totale.

Les taux normaux sont de 40 à 50** g/l **soit 0,5 à** 0,7 **mmolll.

Ses variations pathologiques seront uniquement des hypoalbuminémies (cf. paragraphe 3) car les hyperalbuminémies ne sont rencontrées que dans les syndromes, transitoires, d'hémoconcentration.

1.2. Glycoprotéines

1.2.1. Protéines de transport

En dehors de la sérum-albumine, de nombreuses protéines ont dans le plasma un rôle de transport. Seront décrites ou rappelées ici, à titre d'exemples, la transferrine, la céruléoplasmine, la transcortine.

1.2.1.1. Transferrine

Le fer sérique est transporté par cette p-globuline, (cf. chapitre 4), normalement saturée seulement au tiers de ses possibilités d'accueil.

Il existe plusieurs types génétiques de transferrine, comme l'a montré l'électrophorèse en gel d'amidon ou de polyacrylamide.

Le dosage par immunoprécipitation en milieu liquide ou par immunodiffusion radiale est facile et la transferrine fait le plus souvent partie des « profils protéiques plasmatiques ».

Les taux usuels sont de 1,5 à 3 g/l.

En raison de sa taille (poids moléculaire 90 000 d), la sidérophiline apparaît rapidement dans l'urine, après l'albumine, dans **les syndromes néphrotiques** expliquant l'anémie hypochrome observée souvent dans ces cas.

La transferrinémie est également diminuée dans **l'intoxication éthylique chronique,** où l'on trouve classiquement les signes biologiques suivants : élévations de la gamma-GT, du VGM et des Ig A, diminution par contre de la sérum-albumine et de la transferrine. Le rapport Ig A/transferrine s'élève au-delà de sa valeur normale de 1,2 à 1,5. L'élévation de la transferrine déficiente en acide sialique (carbohydrate déficient transferrin ou CDT des anglo-saxons) semble être actuellement le meilleur marqueur de l'alcoolisme chronique.

1.2.1.2. Céruléoplasmine

Riche en cuivre, ce qui lui donne et sa couleur bleue et son nom, cette a2 glycoprotéine est en fait une **oxydase** dans laquelle le cuivre est un cofacteur.

Elle augmente au cours des états inflammatoires, de la grossesse, des traitements œstrogéniques. Ces variations, cependant, ne présentent pas suffisamment d'intérêt pour inclure la céruléoplasmine dans les « profils protéiques ».

La variation la plus spectaculaire s'observe dans la très rare **maladie de Wilson** où le taux est très diminué, expliquant que le cuivre plasmatique soit fixé, de manière labile, sur la sérum-albumine qu'il pourra quitter pour aller se déposer dans les noyaux gris centraux, le foie, la cornée (cf. chapitre 5).

1.2.1.3. Transcortine

C'est une **α_1-globuline** de poids moléculaire 56 000 d fixant le cortisol avec une grande affinité. Elle est donc comme la SBP *(sex binding protein)* fixant les androgènes, la DBP *(yitamin D binding protein)* ou la *retinol binding protein,* un transporteur particulier d'hormones lipidiques ou de produits proches.

Sa concentration normale est voisine de 70 mg/l.

Elle augmente, classiquement, dans la grossesse et les traitements androgéniques ou œstrogéniques.

Des déficits congénitaux ont été décrits, **liés au chromosome X.**

7.2.2. *Antiprotéases*

On range dans ce groupe une famille de protéines ayant des propriétés inhibitrices vis-à-vis des protéases diverses circulant dans le plasma. Celles-ci sont très nombreuses : la trypsine, la chymotrypsine, la plasmine, la thrombine, l'élastase, la collagénase et d'autres enzymes hydrolytiques libérées par les polynucléaires sont en effet susceptibles d'apparaître dans le plasma.

1.2.2.1. Anti-protéase ou α_1-antitrypsine

Elle est en realité capable d'inhiber bien d'autres sérine-protéases que la trypsine, ce qui explique le nom actuel de cette protéine. C'est une glycoprotéine de petite taille, ayant une demi-vie brève (5 jours). Elle est un inhibiteur puissant des diverses enzymes protéolytiques pouvant être déversées dans le plasma par des tissus ou par des cellules circulantes comme les polynucléaires. On comprend ainsi son augmentation au cours des états inflammatoires où de nombreuses enzymes, en particulier lysosomiales, sont relâchées.

Le polymorphisme génétique de **l'α_1-antiprotéase** est responsable de plusieurs formes moléculaires, individualisables à l'électrophorèse en gel d'amidon ou de polyacrylamide. En effet divers gènes allèles sont impliqués dans la biosynthèse et sont responsables d'un grand nombre de phénotypes. Ainsi l'allèle M, le plus fréquent, entraînera un phénotype MM chez l'homozygote et divers phénotypes hétérozygotes. L'allèle Z conduit parfois à des homozygotes ZZ dont le taux plasmatique est beaucoup plus bas.

Par techniques immunologiques, ***le taux normal** est **de** 2 **à** 4 g/l.*

Il y a cependant des variations liées au phénotype.

Des variations pathologiques sont notées :

- *au cours de l'inflammation* où le taux est banalement augmenté ;
- *les diminutions,* par contre, sont plus intéressantes car génétiques **ou** acquises. Elles intéressent la pathologie pulmonaire et hépatique.

Au cours de bronchopneumopathies et d'emphysèmes, des déficits très importants en **α_1-antitrypsine** ont été observés. Ils frappent surtout les phénotypes ZZ, SS, 00 et sont particulièrement fréquents en Suède où un dépistage systématique a été instauré.

La structure des parois alvéolaires est dégradée par les enzymes protéolytiques des leucocytes, des macrophages et des plaquettes et remplacée par un tissu fibreux non fonctionnel pour les échanges gazeux et dont l'élasticité est quasi nulle.

Au cours de cirrhoses infantiles, observées chez des homozygotes ZZ, on trouve, à la ponction-biopsie hépatique, une accumulation d'α_1-antitrypsine dépourvue d'activité antiprotéasique, responsable de la destruction des cellules et de leur remplacement par du tissu fibreux, expliquant la cirrhose et l'ictère néonatal. Le pronostic est évidemment très sombre et l'emphysème n'a pas le temps de se développer.

Chez l'adulte, une association emphysème, cirrhose et déficit en α_1-antiprotéase a aussi été observée.

Au cours des entéropathies exsudatives, la perte digestive de protéines peut être objectivée par l'étude de l'élimination de l'Qq-antiprotéase. Son dosage dans les selles et dans le plasma permet de calculer une véritable clairance digestive de cette protéine.

1.2.2.2. α_2-macrobuline

Comme son nom l'indique, c'est une volumineuse glycoprotéine de poids moléculaire 750 000 Da, formée par plusieurs subunités réunies par des ponts disulfure.

Elle se combine aux diverses enzymes protéolytiques circulantes (plasmine, collagénase, trypsine et a chymotrypsine, protéases bactériennes et protéases leucocytaires). Elle pourrait ainsi limiter les effets néfastes de la réaction inflammatoire en inhibant les enzymes lysosomiales déversées.

Le dosage immunologique est facile. ***Les valeurs de référence sont: 2 à 3,5 g/l.***

Les variations pathologiques sont surtout en « hyper » :

- augmentation dans les syndromes néphrotiques liée à une synthèse hépatique accrue et à une rétention (partielle) du fait qu'elle ne franchit pas facilement la membrane glomérulaire pathologique. Ainsi se comprend l'augmentation de la fraction électrophorétique α_2 dans les syndromes néphrotiques, accompagnant et contre-balançant peut-être la baisse importante de l'albumine et de nombreuses autres protétines ;

- augmentation dans l'inflammation aiguë, moins nette toutefois que celle de l'orosomucoïde, de l'haptoglobine ou de la CRP.

1.2.3. Immunoglobulines

Autrefois appelées « "y-globulines » du fait de leur migration électrophorétiques majoritairement en zone -y, les immunoglobulines sont le support de l'immunité humorale, sous forme **d'anticorps.**

Les cellules qui fabriquent les anticorps sont les plasmocytes et les lympho-

plasmocytes, tous issus des lymphocytes B et pouvant se développer à partir d'une seule cellule souche pour former un clone lorsque un antigène a été détecté et phagocyté par les macrophages.

Les immunoglobulines sont très hétérogènes, pouvant être classées en 5 classes différentes, objectivées à l'immunoélectrophorèse et définies par la structure de l'une de leurs chaînes, la chaîne lourde (isotypie).

On distingue ainsi : les Ig G avec chaîne lourde Y,
les Ig A - - a
les Ig M - - μ
les Ig D - - 8
les Ig E - - e.

Les trois premières sont quantitativement les plus importantes.

9.2.3.1. *Structure générale*

Toutes les immunoglobulines ont un motif commun constitué de 4 chaînes polypeptidiques, identiques deux à deux (figure 9.1).

Les chaînes dites légères ont un poids moléculaire de 22 000 Da, alors que les plus lourdes ont 50 000 d. Ces chaînes sont réunies entre elles par des ponts disulfure et la coupure qu'elle subissent lors de l'hydrolyse par la papaïne entraîne l'apparition des fragments Fab et Fc bien classiques maintenant. La présence de glucides aboutit finalement à un poids moléculaire de 150 000 **Da.**

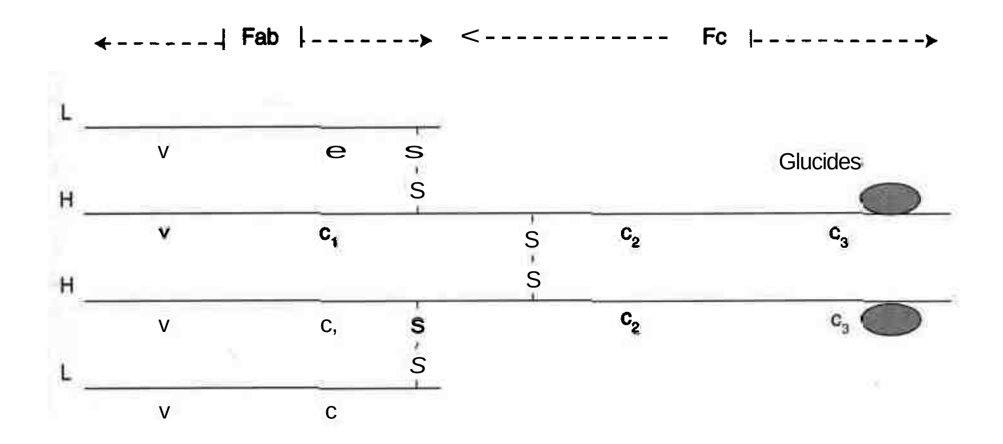


Figure 9.1 • Structure schématique du motif élémentaire des immunoglobulines.

Les fragments Fab sont capables de fixer l'antigène, ce que ne fait pas le fragment Fc, qui tient cependant sous sa dépendance la fixation du complément.

Chaque chaîne lourde est constituée de deux parties :

- *une partie constante* (c), définissant *l'isotypie*, dont la séquence en aminoacides est identique, pour la même espèce, dans toute molécule d'immunoglobuline de la même classe (sous reserve de l'existence *d'allotypes* Gm ou Inv) et
- *une partie variable* (v), responsable de *Vidiotypie*, dont la séquence est adaptée à chaque antigène, permettant sa reconnaissance spécifique.

Les chaînes légères ont seulement deux types de séquence appelés *kappa (K)* et *lambda (X)* qui s'associent avec toutes les variétés de chaînes lourdes. Le type *K* prédomine.

1.2.3.2. Structures particulières

Les *immunoglobulines G* sont sous forme monomérique (poids moléculaire 150 000 Da). Leurs chaînes lourdes sont constituées par 4 sous-classes *yï*, 72, **γ3,** et γ4.

Les *immunoglobulines A* sont présentes dans le plasma et dans les liquides de sécrétion des cellules épithéliales. Dans le plasma, elles sont sous forme monomérique traditionnelle alors que dans les sécrétions elles sont généralement unies (figure 9.2) à une glycoprotéine appelée « pièce sécrétoire » de poids moléculaire 58 000 Da. De plus, une autre glycoprotéine « la chaîne J » peut aussi se fixer sur l'Ig A, provoquant alors sa dimérisation.

Les Ig M ou macroglobulines sont polymérisées, associant généralement 5 subunités monomériques unies entre elles par une chaîne *J*. Leur poids moléculaire atteint ainsi 800 000 ou 1 000 000 Da.

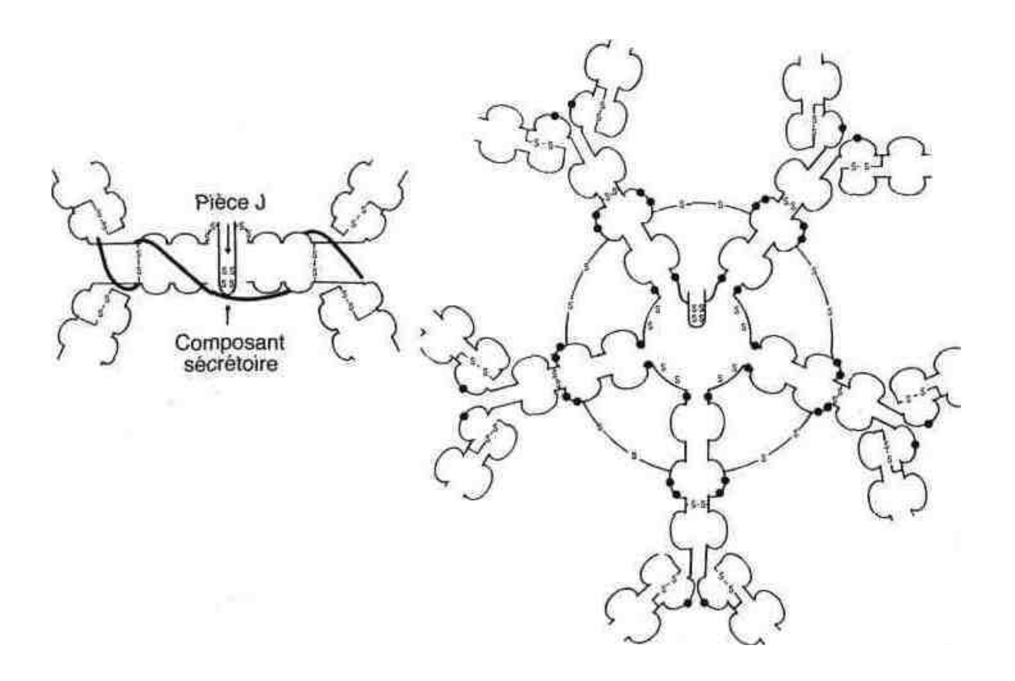


Figure 9.2 • Structures schématiques d'une Ig A (à gauche) et d'une Ig M (à droite).

1.2.3.3. Taux normal des immunoglobulines

Ils varient selon l'âge, les Ig G chutant rapidement après la naissance pour remonter progressivement, comme Ig M et Ig A, à partir de la 4[e] semaine. Des taux constants sont obtenus à environ 4 ans.

Chez l'adulte les valeurs de référence sont les suivantes (tableau 9.1) :

Tableau 9.1 • Concentrations moyennes des immunoglobulines sériques

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Taux (g/l)	8 à 12	2 à 4	0,6 à 1,2	0,1 à 0,3	0,1 à 0,5

1.2.4. Microglobulines

On trouve en zone α_1 et β_2 de l'électrophorèse des protéines de faible poids moléculaire dont la **β_2-microglobuline** est, dans le sérum, le représentant le plus notable.

Glycoprotéine de 12 000 d, elle est produite par les cellules nucléées de l'organisme. Elle fait partie du complexe d'histocompatibilité majeur de la classe I, composé de protéines de membrane cellulaire, en particulier au niveau des lymphocytes, en tant que chaînes légères des antigènes HLA.

Après son relargage des membranes, pour des raisons inconnues, la protéine est facilement filtrée au niveau du glomérule du fait de sa petite taille et elle est ensuite totalement réabsorbée par le tubule rénal.

Le taux plasmatique normal est de 1,2 à 2 mg/l.

Le taux urinaire, normalement faible, augmente dans les tubulopathies et son dosage urinaire est aussi utile pour la surveillance des greffes rénales.

Dans le plasma l'élévation de son taux est observée dans l'insuffisance rénale et dans divers cancers.

Elle augmente, en dehors de toute atteinte rénale, lors de *Yactivation lymphocytaire* (syndromes lymphoprolifératifs; SIDA).

Elle s'accumule dans les tissus lors de l'amylose observée chez les dialyses au long cours dans l'insuffisance rénale chronique.

1.3. Marqueurs d'une pathologie cellulaire

1.3.1. Protéines de l'inflammation

Un certain nombre de protéines plasmatiques voit leur taux augmenter fortement et de manière non spécifique au cours des états inflammatoires. On les appelle « protéines de la phase aiguë ». Leur élévation est due à une augmentation de synthèse hépatique, médiée par l'interleukine 1, qui n'a pas de retentis-

sèment sur la protéinémie totale. Cette élévation est liée à un tropisme particulier de ces protéines pour le foyer inflammatoire mais ne peut avoir de valeur en terme de diagnostic étiologique.

Cependant elles permettent de suivre *l'évolution de la maladie inflammatoire.* Ainsi le dosage de ces protéines peut-il quantifier, voire automatiser la détermination de la **vitesse de sédimentation globulaire,** (VS) si utilisée en France.

La VS est mesurée grâce à un tube d'environ 25 cm de hauteur, rempli de sang citrate et donc incoagulable, maintenu verticalement. Au bout d'une heure, la hauteur de la colonne plasmatique est mesurée avec un décimètre. Elle représente la sédimentation des globules rouges sous l'influence de la gravité et ***elle est normalement < 5 mm.***

Toute augmentation, en dehors d'une anémie, est habituellement le fait d'une *inflammation ou d'un cancer* (VS souvent > 100 mm), ce qui lui donne une valeur de dépistage grossier intéressante.

Elle est cependant non spécifique, peu sensible. Les facteurs diminuant la VS sont la polyglobulie, la macrocytose, l'hypoprotéinémie. Au contraire, l'anémie, la microcytose, la présence de protéines monoclonales l'augmentent. Néanmoins, elle est simple à réaliser et peu coûteuse et reste donc très populaire pour les médecins français.

1.3.1.1. Orosomucoïde

C'est une protéine a,, de faible poids moléculaire (40 000 Da) très riche en sucres et en acide sialique, ce qui lui a conféré aussi le nom de glycoprotéine acide a 1.

Sa concentration normale varie entre 0,6 et 1,2 g/L

Elle s'élève fortement dans les états inflammatoires, en particulier au cours du rhumatisme articulaire aigu de l'enfant ou **maladie de Bouillaud,** dans lequel l'évolution favorable était suivie par la baisse progressive du taux d'orosomucoïde.

1.3.1.2. *Haptoglobine*

Capable de fixer l'hémoglobine, d'où son nom, cette protéine α_2 (Hp) est une glycoprotéine très riche en sucres, constituée dans sa forme monomère la plus simple de quatre chaînes polypeptidiques 2 a et 2 P. Les chaînes (3 sont identiques chez tous les individus, alors que les chaînes a diffèrent car trois gènes distincts peuvent les coder. Ainsi y a-t-il des formes monomères et des formes polymères à transmission génétique.

La fixation d'hémoglobine entraîne la formation d'un complexe Hb-Hp qui a la particularité d'avoir une action enzymatique, de type peroxydasique, mise à profit pour le dépistage du sang sur les bandelettes urinaires ou dans les matières fécales.

Par dosage immunologique, (immunoprécipitation en milieu liquide avec mesure de la dispersion d'un faisceau laser), *le taux varie entre 0,5 et 1,5 g/l.*

Les variations pathologiques observées sont :

- abaissement, voire effondrement dans les hémolyses, particulièrement utile lors des hémolyses discrètes ;

- élévation dans les états inflammatoires, fréquente et banale car l'haptoglobine est un marqueur très sensible de l'inflammation non spécifique. Le taux d'haptoglobine peut s'élever jusqu'à 10 g/l mais n'a ni valeur diagnostique ni pronostique. Ici encore l'intérêt est essentiellement lié à la surveillance de l'évolution du syndrome inflammatoire.

1.3.1.3. Protéine C réactive (CRP)

Glycoprotéine de poids moléculaire 120 000 Da, formée par l'union de 5 sous-unités identiques, cette protéine porte son nom en raison de sa propriété de précipiter au contact du polysaccharide C du pneumocoque.

C'est un marqueur très précoce de l'inflammation (tableau 9.2), s'élevant dans les 2 à 4 heures après le début du processus inflammatoire.

Tableau 9.2 • Principales protéines de la phase aiguë

	Poids moléculaire (Da)	Valeurs usuelles (/l)	Délai d'apparition (heure)
CRP	120 000	<0,006	2 à 4
SAA	12000	<0,01	4 à 6
OROSO	40000	0,6 à 1,2	24 à 48
HAPTO	86000	0,5 à 1,5	id
FIBRINOGENE	340 000	2,5 à 3.5	id
CÉRILÉO	132000	0,2 à 0,4	id
al ANTIPROTÉASE	54 000	2 à 4	id

Elle a, par ailleurs, un rôle d'activation du complément, de facilitation de la phagocytose des bactéries et de modulation de la multiplication des lymphocytes T.

Du fait de sa demi-vie très courte (24 heures), la CRP est aussi un témoin précoce de l'efficacité thérapeutique, lors d'une antibiothérapie par exemple.

Le taux normal varie de 0 à 6 mg/l.

Les élévations de la protéine C réactive sont observées :

- dans tous les **états inflammatoires** où l'augmentation précède celles de l'orosomucoïde et de l'haptoglobine (2 à 3 jours) et du fibrinogène (après 13 jours);

- dans les **infections bactériennes néonatales,** renseignant sur l'efficacité de l'antibiothérapie ;
- dans **la surveillance post-opératoire** où la CRP s'élève systématiquement après l'intervention chirurgicale et atteint son pic en 2 à 3 jours. Si sa concentration sérique continue à s'élever au 4[e] jour, il faut craindre une complication infectieuse.

1.3.1.4. Fibrinogène

Destiné essentiellement à se transformer en fibrine et à former le caillot au cours de la coagulation, le fibrinogène est aussi une protéine de la phase aiguë dont le taux augmente au cours des syndromes inflammatoires. C'est une glycoprotéine constituée de 6 chaînes peptidiques 2 à 2 identiques, de poids moléculaire 330 000 Da. Il est synthétisé dans le foie essentiellement et aussi, faiblement, par les mégacary ocytes.

Le dosage est effectué soit par méthode immunologique (immunodiffusion radiale ou immunoprécipitation) soit par méthode de mesure de sa transformation en fibrine sous l'influence de la thrombine. Le temps de coagulation d'un plasma dilué est en effet proportionnel à la concentration en fibrinogène, pour une zone donnée de concentration. La calibration de ce dosage est cependant délicate.

Les valeurs de référence chez l'adulte sont 2,5 à 3,5 g/l.

L'intérêt du dosage du fibrinogène sera donc mixte, dans tout **processus inflammatoire,** où son élévation accompagnera celle de la VS et des autres marqueurs protéiques et en **hémostase,** où le temps de thrombine explore plus particulièrement la fibrinoformation.

1.3.1.5. Sérum amyloïde A protéine

La sérum amyloïde A protéine ou SAA est la plus petite des protéines de la phase aiguë (poids moléculaire 12 000 Da).

Elle apparaît précocement dans toute inflammation aiguë.

1.3.2. Marqueurs tumoraux

Les marqueurs biologiques des cancers sont des molécules fabriquées par les cellules tumorales et présentes dans la circulation sanguine.

La transformation maligne de nombreuses cellules s'accompagne de l'activation **d'oncogènes ou de proto-oncogènes** déclenchant la biosynthèse de protéines dites « transformantes », enzymes de type protéine-kinases, facteurs de croissance pouvant alors expliquer à leur tour le développement anarchique du cancer. C'est le cas de l'oncogène V-erb-B codant le récepteur membranaire de l'EGF (epidermal growth factor), ou du gène p53 codant une protéine s'accumulant dans les cellules tumorales et détectable par immuno-histochimie.

Ailleurs la multiplication cancéreuse entraîne une **production hormonale** susceptible d'être reconnue comme moyen de diagnostic : forte élévation de la gonadotrophine chorionique HCG dans les choriocarcinomes, de la sérotonine dans les tumeurs carcinoïdes du grêle, de l'hormone anti-diurétique ADH dans les cancers bronchiques à petites cellules, responsable du syndrome de Schwartz-Bartter.

Enfin parfois la transformation néoplasique est associée à la réactivation de gènes codant pour des **protéines qui sont normalement absentes** ou présentes à de très faibles taux à l'état normal. C'est le cas, par exemple, de l'antigène carcinoembryonnaire ACE, de l'a-fœtoprotéine AFP, appelés dès lors antigènes « oncofœtaux ».

Tous ces marqueurs permettent au laboratoire qui les dose de participer au diagnostic ou surtout à la ***surveillance de l'évolution des cancers en cause.***

Bien sûr le marqueur tumoral idéal n'existe pas car cette substance devrait avoir les propriétés suivantes : fabriquée par la tumeur elle-même, elle devrait permettre le diagnostic, l'appréciation de la masse tumorale, son extension métastatique éventuelle, et aussi l'apport de substances thérapeutiques localement (immunothérapie par anticorps monoclonaux dirigés contre cette substance).

Nous décrirons quelques marqueurs d'utilisation courante (tableau 9.3).

Tableau 9.3 • Intérêt clinique de quelques marqueurs tumoraux.

Marqueur	Normalité	Cancer	Diagnostic	Pronostic	Suivi
AGE	< 7 µg/l	Côlon	0	+	++
AFP	< 10 µg/l	Foie	+	++	+++
PSA	< 4 µg/l	Prostate	+/-	+	+++
ÇA 15-3	25 U/ml	Sein	0	+	++
ÇA 125	< 35 U/ml	Ovaire	0	+	++
CA19-9	< 35 U/ml	Pancréas	0	+++	
hCG	< 0,4 µg/l	Testicule	++	++	+++

1.3.2.1. Antigène carcinoembryonnaire

L'antigène carcinoembryonnaire (ACE) est une glycoprotéine présente dans le foie, l'intestin et le pancréas fœtal au cours des premiers mois de la grossesse. Cet antigène oncofœtal a été mis en évidence d'abord dans les cancers du côlon, grâce à des anticorps monoclonaux, puis dans d'autres tissus normaux où son taux reste cependant très faible.

Le dosage est possible par méthode immunologique, avec marqueur isotopique aussi bien qu'avec marqueur froid, enzymatique par exemple.

Les taux normaux varient avec la technique utilisée.

Ils sont habituellement <7 pg/l.

L'intérêt clinique n'est pas le diagnostic des **cancers du côlon ou du sein** mais la **surveillance thérapeutique et pronostique** chez un patient déterminé. Dans le cancer du côlon, le taux préopératoire de l'ACE une valeur pronostique, des taux élevés laissent soupçonner une récidive après la résection chirurgicale, d'autant plus rapidement que le taux est plus élevé.

L'ACE n'a aucun intérêt en dépistage de masse.

1.3.2.2. a-fœtoprotéine

L'alpha-fœtoprotéine (AFP) est une glycoprotéine du sérum fœtal disparaissant dans les semaines qui suivent la naissance.

Les méthodes de dosage immunologique sont nombreuses par précipitation, technique radio-isotopique ou par marqueur non isotopique.

La limite supérieure de la normale est comprise entre 10 et 20 / J / l.

L'intérêt de l'AFP vient de son élévation dans un grand nombre de **carcinomes hépatocellulaires** pour lesquels, associée à l'échographie, elle sera un bon élément de diagnostic, confirmé bien sûr par l'histologie après ponction biopsie.

Ce n'est pas toutefois un marqueur précoce et son rôle dans le suivi de l'évolution après exérèse est donc encore plus important.

Il faut noter cependant que l'hépatocarcinome est rare en Europe, mais fréquent en Afrique de l'Est, et que dans notre pays les cas de cancers primitifs du foie sont rares, limités aux adénocancers sur cirrhose.

L'AFP est aussi un marqueur intéressant des tumeurs testiculaires où il est augmenté, avec hCG et p hCG, dans 70 % des tumeurs germinales en dehors des séminomes. Dans ces cas, les marqueurs ont un grand rôle diagnostique car dépistées précocement, ces tumeurs ont un pronostic favorable.

Enfin en **pathologie obstétricale,** l'AFP est utilisée comme marqueur d'anomalies du développement du tube neural du fœtus *(spina bifida,* anencéphalie par exemple).

1.3.2.3. *Antigène spécifique de la prostate (PSA)*

Produite dans les cellules épithéliales de la prostate, cette protéine ou « prostate spécifie antigen » ou PSA, de poids moléculaire 33 kDa appartient au groupe des kallicréines. Elle est abondante dans le liquide séminal. C'est une protéase, exerçant des fonctions enzymatiques de type trypsine et chymotrypsine-like. Elle n'offre aucune parenté ni physiologique ni biochimique avec les phosphatases acides prostatiques qui ne sont plus utilisées en pratique courante.

Le PSA circule dans le sang sous plusieurs formes : libre, complexé à l'α_1-antichymotrypsine, complexé à **l'α_2-macroglobuline**, inaccessible dans ce cas aux dosages immunologiques.

Le dosage classique concerne PSA total < 4 mg/1

Il doit être effectué **avant tout toucher rectal qui libère des quantités massives de PSA.** La fraction libre est maintenant accessible au dosage, permettant d'étudier le rapport PSA libre/ PSA total.

Son intérêt clinique est lié à la pathologie prostatique et en particulier au cancer de la prostate, le plus fréquent des cancers masculins.

Il est alors souvent considéré comme un marqueur ayant une petite valeur diagnostique permettant, pour des taux entre 4 et 10 mg/1 de différencier adénome ou hypertrophie bénigne de la prostate et cancer. Cependant le PSA s'élève avec l'âge, avec l'hypertrophie bénigne et il faut alors étudier le rapport PSA libre / PSA total, accompagné du toucher rectal, de l'échographie pour décider de faire une biopsie.

Plus le rapport baisse, plus le risque de cancer est élevé, car la fraction de PSA libre est significativement plus faible chez les sujets porteurs d'un cancer, et en dessous de 15 pour ce rapport, la biopsie est indiquée.

Le dosage de PSA total est aussi utile pour la surveillance post-thérapeutique, qu'elle soit hormonale, chirurgicale ou radiothérapique.

1.3.2.4. Hormone chorionique gonadotrophique

L'hormone chorionique gonadotrope (hCG) est une hormone glycoprotéique, faite de 145 aminoacides et synthétisée par le placenta (syncytiotrophoblaste). Deux sous-unités sont présentes. La chaîne a est identique à celle de LH, FSH et TSH. La chaîne (3 en revanche est spécifique et est d'ailleurs souvent dosée isolément sous le nom de p hCG.

***Les valeurs usuelles, en dehors de la grossesse, sont < 0,4 μg/l ou** 8 Vil.*

hCG ou p hCG est utilisée pour **le diagnostic précoce de la grossesse,** car elle est détectable dans les urines à partir du 8e jour après la fécondation. Les nombreuses trousses disponibles en pharmacie assurent plus ou moins bien ce rôle diagnostique.

En pathologie, hCG et p hCG représentent des marqueurs des tumeurs d'origine trophoblastique :

- **tumeurs testiculaires** en dehors des séminomes, bien que certains de ceux-ci aient des taux élevés d'hCG ;
- **grossesse molaire ou choriocarcinome** en pathologie obstétricale.

Dans ces divers cas hCG a une valeur majeure pour le diagnostic et **pour la** surveillance de ces tumeurs.

1.3.2.5. ***ÇA 15-3***

II s'agit du « cancer antigen» 15-3, glycoprotéine identifiée dans le plasma au cours des tumeurs mammaires humaines. Il est défini et dosé grâce à deux anticorps monoclonaux obtenus par hybridation de cellules de myélome murin avec des cellules de souris immunisées par des lipoprotéines du lait humain et par des cellules de tumeurs mammaires.

Ce marqueur peut être utilisé pour le **bilan d'extension et la surveillance des cancers du sein** car il s'élève très précocement lors de la survenue de métastases, souvent même avant la traduction clinique de celles-ci.

1.3.2.6. CA-125

Le CA-125 représente en réalité un ensemble d'antigènes ayant en commun un épitope reconnu par l'anticorps monoclonal OC 125. Cet anticorps est obtenu à partir de souris immunisées contre des cellules de carcinome ovarien humain.

Il s'agit donc d'un **marqueur du cancer de l'ovaire,** quel qu'en soit le type histologique, utilisé encore pour le suivi des malades et non pour le diagnostic.

1.3.2.7. ÇA 19-9

Le ÇA 19-9 a été isolé grâce à un anticorps monoclonal de souris dirigé contre des cellules d'adénocarcinome du côlon humain.

Des taux élevés de cet antigène sont observés dans les cancers pancréatiques et les cancers du côlon. Sa spécificité pour les cancers du tractus digestif est bonne, en particulier pour **les adénocarcinomes du pancréas,** ce qui lui permet de participer en partie au diagnostic, difficile, de ce cancer profond. Il permet en effet de faire la différence entre une pancréatite chronique et un cancer.

Comme pour les autres marqueurs, toutefois, l'intérêt est surtout dans le suivi de l'évolution.

1.3.3. Marqueurs non enzymatiques de la souffrance myocardique

Les marqueurs biologiques d'un infarctus du myocarde (IDM) ont beaucoup évolué depuis quelques années. Les enzymes localisées dans le cytoplasme, telles que transaminases, créatine kinase, lacticodéshydrogènase ont été devancées par des protéines impliquées dans des fonctions métaboliques (myoglobine) soit par des protéines structurales (myosine et troponine).

1.3.3.1. *Myoglobine*

La myoglobine est présente dans tous les types de myocyte ; elle a un faible poids moléculaire et elle est localisée préférentiellement dans le cytoplasme. Elle passe très rapidement dans le sérum ce qui en fait un excellent marqueur précoce. Elle a une faible spécificité d'organe puisqu'elle augmente aussi bien dans les pathologies cardiaques (infarctus, chirurgie cardiaque) que musculaires (exercice intense, traumatisme, chirurgie, rhabdomyolyse). Son métabolisme est essentiellement rénal. Le diagnostic de nécrose cardiaque ne peut donc pas être basé uniquement sur ce test chez des patients en insuffisance rénale. Pour affirmer la présence d'une nécrose l'élévation de myoglobine doit toujours être

confirmée par un test beaucoup plus sélectif comme la CK_{MB} massique ou la troponine 1 cardiaque ou troponine T cardiaque (Tnic, TnTc).

Valeurs usuelles de la myoglobine < 80 μg/l (Stratus SCS Dade Behring)

1.3.3.2. CK_{MB} massique

La CK_{MB} massique associée au dosage de la myoglobine peut permettre un bon classement des malades présentant ou non un infarctus du myocarde.

La CK_{MB} massique a une spécificité inférieure à la troponine le surtout en bas de pathologie musculaire associée, bien que ces deux paramètres gardent des caractéristiques cinétiques post IDM semblables.

• *1.3.3.3. Troponines*

Le filament fin du myocyte, régulateur de la contraction myocardique, est composé principalement de l'actine, de la tropomyosine et du complexe des troponines.

Le complexe des troponines se compose de trois protéines I, C et T.

La troponine C (TnC) fixe le calcium. Son dosage n'a aucun intérêt dans le diagnostic des pathologies cardiaques puisque les formes exprimées par le myocarde ne sont pas différentes de celles du muscle squelettique.

La troponine 1 (Tnl) fixe le filament d'actine à la TnC et empêche la contraction en l'absence de calcium.

La troponine T (TnT) lie le complexe troponine à la tropomyosine.

Les troponines T et 1 possèdent des isoformes cardiaques différentes des isoformes musculaires ce qui permet un dosage par méthode immunologique.

Les isoformes cardiaques de la Tnic et de la TnTc sont des marqueurs spécifiques du myocarde et leur dosage est d'un grand intérêt clinique.

> INTÉRÊTS CLINIQUES DU DOSAGE DE LA TROPONINE

Une élévation même modérée des marqueurs définit un patient à risque. L'importance de ce risque est proportionnelle à l'élévation de la concentration en troponine 1 ou T. Il existe pour les marqueurs cardiaques deux seuils diagnostiques. Le premier seuil correspond à la valeur obtenue dans une population indemne de pathologie cardiaque (valeur seuil de la population de référence). Le deuxième est le seuil décisionnel de l'infarctus du myocarde. Tout patient présentant une valeur intermédiaire entre les deux seuils doit être suivi et est considéré comme présentant des « dommages myocardiques ».

Valeurs usuelles de la troponine le < 0,10 μg/l (Stratus SCS Dade Behring)

Dans les cas classiques d'infarctus du myocarde, le diagnostic peut être affirmé par l'association des signes cliniques et électrocardiographiques qui suf-

fit dans un cas sur **deux** : le dosage des marqueurs cardiaques n'est alors pas nécessaire.

Les protéines sont relarguées dans la circulation en fonction de leur poids moléculaire et de leur localisation cellulaire. Les protéines de faible poids moléculaire et présentes dans le cytosol sont les premières à apparaître. L'intérêt de la Tnic réside dans sa cardiospécificité.

Après une période initiale de 2 à 3 heures au cours de laquelle les taux plasmatiques restent normaux, on assiste à l'élévation successive de la myoglobine (2-3 h) puis de la CK_{MB}, de la troponine et des CK totales. Les taux reviennent à la normale selon des délais différents suivant les marqueurs, mais dans un ordre identique à celui de leur élévation. La myoglobine a un retour à la normale en 48 h.

Le diagnostic d'exclusion d'IDM ne devrait jamais se baser sur les résultats d'un prélèvement unique. En cas de suspicion d'IDM, un seul test négatif ne saurait en rien éliminer le diagnostic. La probabilité de positiver les tests s'accroît avec le temps. À la 9e heure, la probabilité est maximale.

En pratique, le délai entre le début des symptômes et l'arrivée aux urgences étant variable d'un patient à l'autre, deux marqueurs biochimiques doivent être utilisés pour le diagnostic d'IDM : un marqueur précoce (positif dans les 6 premières heures après la douleur) et un marqueur de certitude (positif dans les 6 à 12 heures mais hautement sensible et spécifique d'une lésion myocardique). L'arbre décisionnel qui utilise le couple myoglobine-troponine est d'un grand secours puisqu'il allie la rapidité, grâce à la myoglobine, à la spécificité de la troponine (figure 9.3).

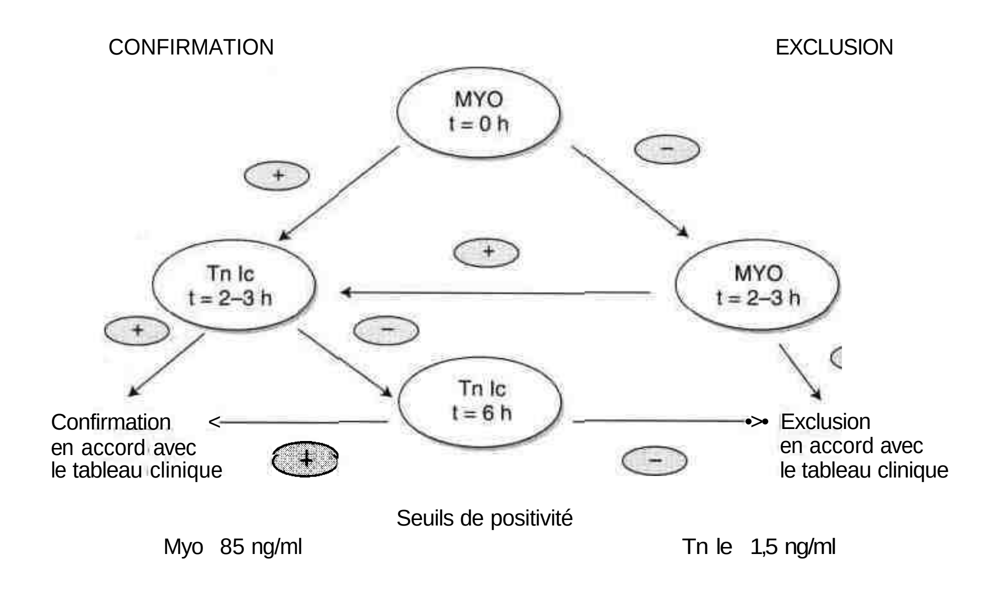


Figure 9.3 • Proposition d'un arbre décisionnel pour confirmer ou exclure un infarctus du myocarde.

▶ REMARQUE

A défaut de pouvoir dater précisément le début des épisodes douloureux, tous les prélèvements doivent se référer à l'heure d'admission.

Il est important de suivre la cinétique des marqueurs cardiaques au cours de l'infarctus du myocarde (figure 9.4).

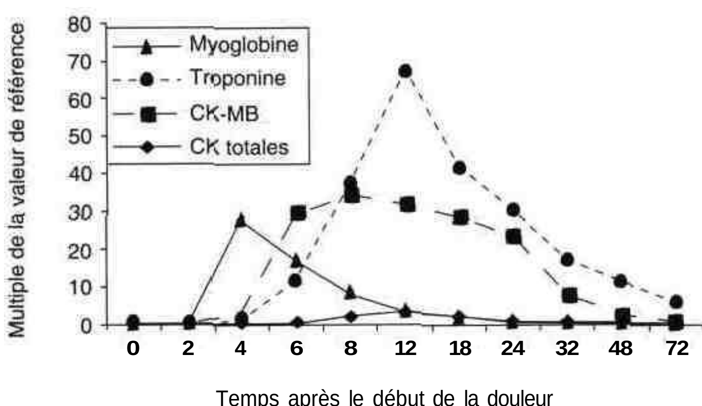


Figure 9.4 • Cinétique des marqueurs cardiaques au cours de l'infarctus du myocarde.

Comme les concentrations élevées en Tnic peuvent être détectées dans le sérum jusqu'à 10 jours après l'infarctus, ce marqueur présente un intérêt dans le diagnostic rétrospectif des infarctus du myocarde, un rôle jusque là tenu par la détermination des **LDH.**

La reperfusion est l'objectif thérapeutique essentiel en cas d'infarctus du myocarde ; elle doit être réalisée le plus rapidement possible, au mieux entre 6 et 12 heures après le début des douleurs. Cet objectif peut être atteint par un traitement chimique (agent thrombolytique) ou physique (angioplastie). En permettant la recirculation coronaire, elle limite l'importance de la nécrose et diminue la mortalité de l'infarctus du myocarde.

La Tnic joue aussi un rôle important dans **l'angor instable.**

Chez les patients admis aux urgences pour angor instable, la valeur de la TnIC permettrait un classement précoce des malades. Une valeur seuil de 0,40 **µg/l** de Tnic est associée à une prévalence de mortalité plus importante à 42 jours (3,7 % contre 1,0 %). La mortalité est proportionnelle à la valeur de la Tnic à l'admission. L'augmentation de la Tnic au cours du suivi du malade est proportionnelle au risque de mortalité.

Dans les **atteintes musculaires,** alors que beaucoup de marqueurs cardiaques sont augmentés la troponine le reste le marqueur le plus spécifique. C'est aussi le cas de rhabdomyolyse d'origine septique, chez les polytraumatisés et chez les insuffisants rénaux.

Le dosage de la Tnic a aussi été préconisé :

- dans le suivi de la cardiotoxicité chimio-induite par les anticancéreux,
- dans le diagnostic des contusions cardiaques,
- dans l'ischémie myocardique observée au cours des états septiques graves,
- dans la sélection des greffons prélevés en vue de la transplantation cardiaque,
- dans l'hypothyroïdie où la CK_{MB} est fréquemment augmentée, la Tnic reste toujours inférieure à la normale,
- dans l'intoxication par le monoxyde de carbone, la valeur de la Tnic serait corrélée à l'augmentation de la carboxyhémoglobine.

1.3.3.4. Myosine

La myosine est une protéine myofibrillaire interagissant réversiblement avec l'actine durant la contraction musculaire. Elle est constituée de deux chaînes lourdes et de deux chaînes légères. Les chaînes légères sont de deux types 1 et II et possèdent plusieurs isoformes de structure moléculaire différente. Cependant on ne connaît pas d'isoformes du muscle cardiaque.

La détermination des chaînes lourdes se fait par radioimmunologie, méthode longue et réservée à des laboratoires spécialisés..

Il existe également des méthodes immunologiques froides utilisant des anticorps anti-chaînes lourdes et anti-chaînes légères.

2. *Exploration*

L'exploration des protéines plasmatiques est réalisée par le dosage individuel **de** telle ou telle protéine, par le regroupement de quelques dosages, sous le terme de profil protéique, par l'électrophorèse qui peut être faite sur des supports différents et enfin par l'étude éventuelle d'une protéinurie.

2.1. Dosages protéiques

Ils concernent, soit la protéinémie totale, soit des dosages individuels de protéines plasmatiques.

2.1.1. Protidémie totale

Le dosage des protéines ou protides totaux est extrêmement classique.

Il est effectué par la traditionnelle réaction du biuret, plus ou moins modifiée

pour s'adapter aux analyseurs biochimiques multiparamétriques ou par la simple réfractométrie.

Le taux normal est de 65 à 75 g/l.

2.1.2. Dosage de protéines particulières

.2.1.2.1. Dosages isolés

1 Toutes les protéines dont nous avons parlé ci-dessus peuvent, bien sûr, être dosées individuellement, par des méthodes immunométriques maintenant automatisées.

Leur dosage est habituellement demandé à l'occasion d'un syndrome ou d'une maladie particulière. Ainsi, par exemple, la concentration de la *sérum-albumine,* associée aux *facteurs de l'hémostase,* est-elle très utile dans une insuffisance cellulaire hépatique.

Sur le plan technique, diverses méthodes sont utilisables :

- dosages turbidimétrique ou néphélémétrique laser après immunoprécipitation,
- dosage radio-immunologique avec marqueur isotopique,
- dosage avec marqueur « froid » : enzyme, composé fluorescent, composé chimiluminescent.

2.1.2.2. Profil protéique

C'est la représentation graphique des dosages de plusieurs protéines, exprimés en g/l ou mieux en pourcentage de la normale en fonction de l'âge et du sexe du sujet.

Deux types de profils peuvent être envisagés :

- *Un profil élargi, à 8 ou 10 protéines, dit d'orientation,* comportant (figure 9.5) une série de protéines très différentes en ce qui concerne leur origine, leur demi-vie, leurs fonctions ou leur régulation. Ce type de bilan est destiné à mettre en évidence un maximum d'information biologique utile au diagnostic ou au dépistage de complications. Il sera toujours accompagné d'une électrophorèse.

Les indications les plus fréquentes sont reliées aux situations suivantes :

- débrouiller des hypothèses diagnostiques suggérées par une VS accélérée, une fièvre prolongée, une altération inexpliquée de l'état général, des algies diffuses avec ou sans syndrome inflammatoire clinique ;
- caractériser la nature et l'étiologie d'une anémie ;
- préciser la fuite protéique en cas d'entéropathie exsudative ;
- mettre en évidence un déficit immunitaire au cours d'infections chroniques ou récidivantes ;

- *Un profil minimum ou ciblé, de 2 à 3 protéines,* destiné essentiellement au suivi évolutif d'un syndrome inflammatoire, d'une intervention chirurgicale, d'un état de dénutrition profonde ou d'une hémolyse chronique.

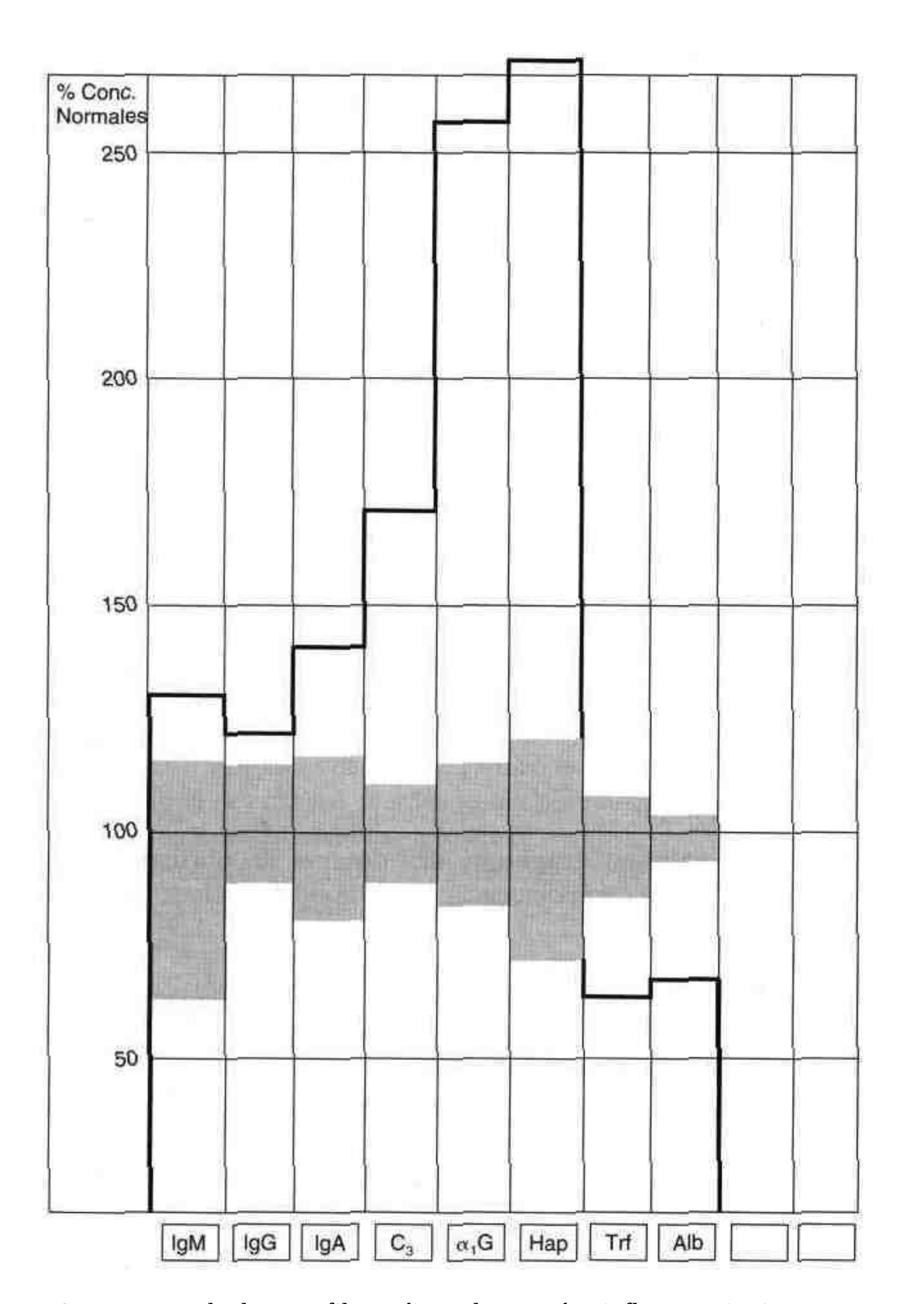


Figure 9.5 • Exemple d'un profil protéique dans un état inflammatoire intense.

(D'après P. Giraudet.) (C_3 = fraction C, du complément, **α_1G** = **α_1** glycoprotéine acide ou orosomucoïde, Hap = haptoglobine, Trf = transferrine, Alb = albumine.

2.2 Electrophorèse des protéines plasmatiques

2.2.2. *Protéinogramme*

L'électrophorèse consiste à faire migrer et à fractionner grâce à un champ électrique, au sein d'un milieu variable et dans un tampon de pH déterminé, les protéines séparées par leur **charge électrique.**

A côté de la charge électrique, interviennent aussi :

- le courant liquidien, allant d'un bac à l'autre pour compenser la perte de liquide par évaporation du fait de la chaleur provoquée par le courant électrique (effet Joule) ;

- la diffusion, les particules incluses dans le gel ayant tendance à diffuser des régions les plus concentrées vers les moins concentrées, ce qui gène la bonne séparation des zones ;

- la **taille des particules** car à charge égale, une molécule plus petite migrera plus vite. Cet effet de tamisage moléculaire est surtout important pour les gels de polycrylamide.

Le choix du support est maintenant essentiel. Après Tiselius et l'électrophorèse en veine liquide, le support a été très longtemps le papier, remplacé ensuite par la *membrane d'acétate de cellulose,* puis le *gel d'agarose* qui permet une meilleure séparation et la détection de protéines monoclonales de faible concentration. Le gel d'amidon est d'un maniement délicat ; par contre le gel de *polyacrylamide* a un très fort pouvoir séparateur utile pour les lipoprotéines et les apoprotéines.

La technique consiste à *déposer quelques microlitres de sérum* sur le support, à choisir un tampon, qui est généralement à pH 8,6 auquel les protéines s'ionisent comme des anions, migrant donc vers l'anode, à *laisser migrer durant un temps fonction du support :* 15 à 25 minutes pour l'acétate, 30 à 60 minutes pour le gel de polyacrylamide.

Fixation et coloration sont, dans le temps suivant, habituellement faites avec le même réactif. Cependant le colorant varie avec la nature des composants à révéler. Pour le protéinogramme standard les colorants les plus utilisés sont l'amidoschwarz, le vert de lissamine, le rouge Ponceau ou le bleu de Coomassie.

Après *transparisation du support,* la *lecture photodensitométrique* de la coloration de chaque bande donne le tracé classique (figure 9.6) où apparaissent les 5 pics : Albumine, α_1, α_2, p et y-globulines. *L'intégration de la surface de chaque pic* conduit enfin à un pourcentage de chaque fraction, traduit aussi en gramme/litre si le taux des protéines totales a été donné à l'appareil.

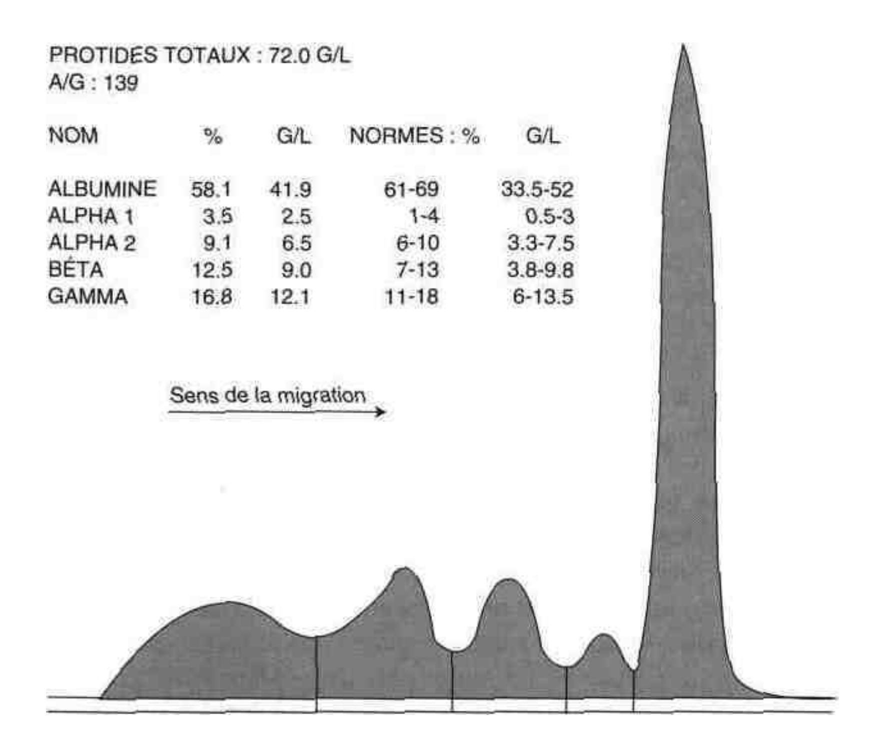


Figure 9.6 • Courbe électrophorétique normale avec les pourcentages des fractions et leur taux en g/1.

2.2.2. Immunoélectrophorèse et immunofîxation

L'analyse immunoélectrophorétique combine les principes de l'électrophorèse en gélose des protéines et de l'immunodiffusion.

Après séparation des protéines par le champ électrique, on dépose les anticorps (immunsérum anti-protéines plasmatiques humaines, ou immunsérums spécifiques de telle ou telle protéine) dans une gouttière parallèle à l'axe de migration. La rencontre Ag-Ac se traduit, après la diffusion, par un arc de précipitation.

L'immunoHxation, (figure 9.7) plus rapide, plus performante et d'interprétation plus aisée tend de plus en plus à remplacer l'immunoélectrophorèse.

L'électrophorèse des protéines en gel d'agarose est suivie par une immunoprécipitation in situ des immunoglobulines avec des antisérums spécifiques de chaque isotype incubés à la surface du gel. Cette technique est particulièrement utile pour le typage des protéines monoclonales : sur un même gel six pistes du même échantillon subissent l'électrophorèse puis cinq pistes sont recouvertes chacune d'un immusérum monospécifique (anti-IgG, anti-IgA, anti-IgM, anti-K, anti-\), la dernière piste étant mise en contact avec un réactif fixateur des protéines pour servir de référence.

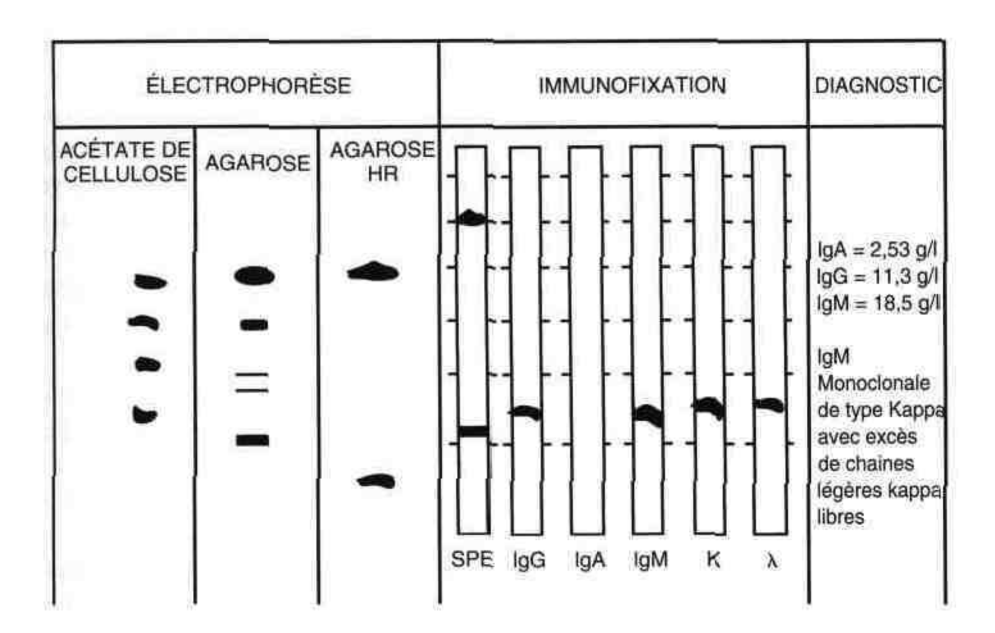


Figure 9.7 • Exemple de tracé en électrophorèse et en immunofixation.

2.3. Etude de la protéinurie

Au-delà de la protéinurie physiologique, inférieure à 150 mg/24 h, la protéinurie est pathologique et elle constitue un marqueur sensible et précoce de toute affection rénale. Son étude apporte un complément non négligeable au dossier clinique et biologique.

En effet, d'une part la quantité de protéines éliminées dépend de l'étiologie et de la gravité des lésions et d'autre part *la nature de ces protéines urinaires ainsi que leurs proportions renseigne sur la localisation de l'atteinte rénale, glomé-ruiaire, tubulaire ou mixte.* De plus, la recherche d'une protéine de Bence Jones (PBJ) est importante pour le diagnostic ou la confirmation du diagnostic d'une dysglobulinémie monoclonale.

• **Le dosage des protéines urinaires,** détectées par la positivité de la bandelette spécifique, est toujours assez difficile car les méthodes sont nombreuses mais peu exactes ; les techniques récentes au rouge de pyrogallol ou au bleu de Coomassie sont actuellement les plus recommandables.

• **L'électrophorèse des urines** est donc une méthode de choix car elle permet de visualiser toutes les protéines présentes mais elle nécessite parfois une concentration préalable, source d'erreurs non négligeables. Aussi la méthode recommandée est-elle l'électrophorèse à haute résolution (HR) qui permet, grâce à sa haute sensibilité, de fractionner les protéines dans l'urine pure. Cependant en cas de protéinurie modérée, < 1 g/1, même cette technique risque de laisser échapper une PBJ et il faut recourir alors à l'immunofixation.

- L'étude qualitative de la protéinurie permet de la définir, de la classer en fonction de son origine (tableau 9.4) :

- *Protéinurie tabulaire,* comportant peu d'albumine mais toutes les globulines du sérum, α_1, α_2, (3, y- Le marqueur tubulaire le plus classique est la β_2*-microglobuline* **mais** son augmentation peut résulter d'une surcharge des récepteurs tubulaires par accroissement de sa concentration sérique et à l'inverse une diminution de son taux urinaire peut être simplement liée à son instabilité à pH acide. C'est la raison pour laquelle le dosage de la *retinol binding protein ou RBP* paraît être actuellement le meilleur reflet de l'atteinte tubulaire.

- *Protéinurie glomérulaire sélective* faite de protéines de bas poids moléculaire, albumine surtout, dépassant 80 % mais aussi transferrine dans un net pic

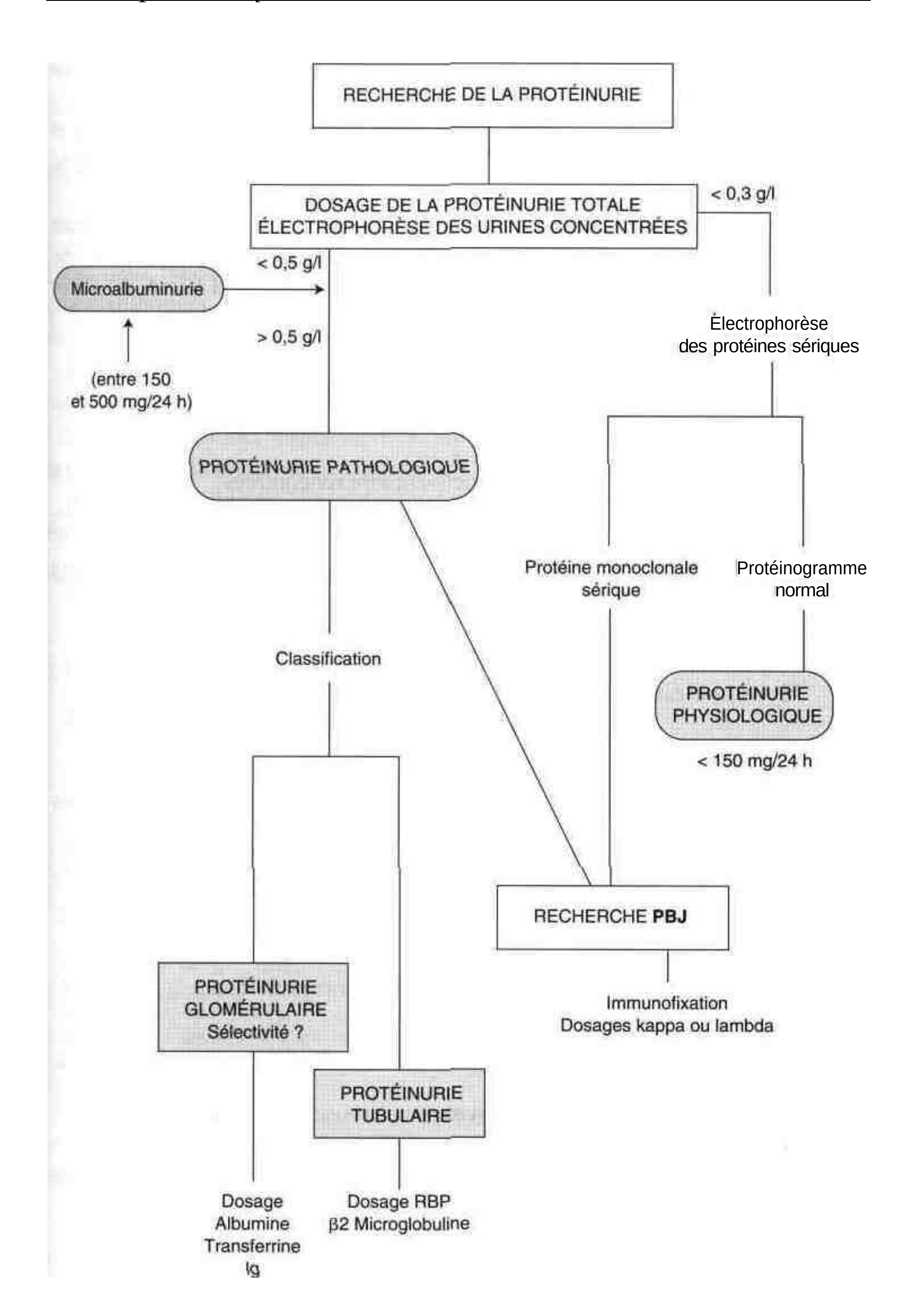
P.

L'étude précise de la sélectivité de la protéinurie, qui était précédemment complexe à réaliser par comparaison des clairances de la transferrine et de l'Ig **G,** est maintenant simple grâce à l'apparition de *nouvelles trousses d'immunofixation* renfermant des immunsérums dirigés contre les protéines habituellement d'origine glomérulaire ou contre les protéines d'origine tubulaire.

De plus la détection de faibles quantités d'albumine **(microalbuminurie)** peut être réalisée par l'emploi de *bandelettes spécifiques* associant de manière originale chromatographie et immunoenzymologie. Cela est particulièrement intéressant chez le diabétique dont la si fréquente microangiopathie rénale s'exprimera rapidement par une microalbuminurie de l'ordre de 300 mg/24 h. C'est un marqueur de néphropathie débutante dans le DID et un marqueur de risque vasculaire athéroscléreux chez les DNID.

Tableau 9.4 • Classification d'une protéinurie.

	Albumine PM=69000	**Transferrine PM=77000**	**Ig G PM=150000**	**Microprotéines**
Protéinurie physiologique	Traces	0	Traces	0
Atteinte glomérulaire sélective	+	+	Traces	0
Atteinte glomérulaire non sélective	+	+	++	0
Atteinte tubulaire	Traces	0	Traces	+
Atteinte mixte glomérulaire et tubulaire	+	+	+	+



re 9.8 • Stratégie d'étude d'une protéinurie.

• *Protéinurie glomérulaire non sélective,* dans laquelle toutes les protéines du plasma sanguin peuvent être représentées.

En pratique tous les types intermédiaires de protéinurie peuvent s'observer et il n'y a d'ailleurs pas de *parallélisme strict entre la sélectivité de la protéinurie et l'importance des lésions glomérulaires.*

La détection d'une protéine de Bence-Jones (PBJ) en électrophorèse simple (figure 9.8) ou en électrophorèse à haute résolution doit être confirmée par l'immunofixation en utilisant 3 immunsérums : anti Ig total (G, A, M, D et E), anti-K et anti-Â..

3. *Variations pathologiques*

Des hypo- et des hyperprotéinémies peuvent être rencontrées.

Les premières portent surtout sur la sérumalbumine et les immunoglobulines.

Les secondes atteignent exclusivement les globulines car l'hyperalbuminémie n'est que relative dans les états d'hémoconcentration.

3.1 Hypoprotéinémies

3.1.1. Hypoalbuminémies

Elles sont provoquées par des défauts de synthèse ou par des déperditions d'origine diverse.

3.1.1.1. *Défauts de synthèse*

Ils sont notés au cours :

- **Des carences nutritionnelles** par défaut d'apport protéique :
  • kwashiorkor et marasme ;
  • malabsorptions et maldigestions ;
  • cachexie cancéreuse.
- **Des atteintes hépatocellulaires graves :** cirrhoses, ictères graves.
- **Des syndromes inflammatoires.**
- **Des synthèses anormalement élevées d'autres protéines,** par mécanisme de compétition, au cours par exemple des dysglobulinémies monoclonales.

3.1.1.2. Déperditions

Ce sont, dans notre pays, les causes les plus fréquentes.

• **Perte rénale.** Elle est très importante lors des **syndromes néphrétiques,** (figure 9.9) associant :

- *une fuite rénale d'albumine, d'orosomucoïde, de transferrine* du fait de leurs faibles poids moléculaires, produisant une protéinurie parfois massive ;
- *une hypoprotéinémie avec hypoalbuminémie,* responsable d'une chute de la pression oncotique, elle-même cause des :
- *œdèmes* blancs, mous, prenant le godet et donc typiquement rénaux.

La glomérulite membraneuse responsable de ces désordres entraîne, suivant l'âge, deux types de syndrome : le syndrome néphrotique de l'adulte se compliquant volontiers d'insuffisance rénale et la néphrose de l'enfant classiquement de meilleur pronostic.

Les tracés électrophorétiques sont très évocateurs avec un effondrement du pic de l'albumine, une baisse généralisée de toutes les protéines à l'exception de l'α_2–macroglobuline, responsable du pic en zone α_2 et d'un pic en zone β lié à la présence de P-lipoprotéines en excès.

• **Perte digestive au cours des entéropathies exsudatives** dans lesquelles la fuite protéique peut être considérable mais difficile à apprécier en raison de la protéolyse par la flore bactérienne intestinale.

• **Perte cutanée dans les brûlures étendues.**

3.1.2. Hypogammaglobulinémies

Elles peuvent être acquises ou congénitales.

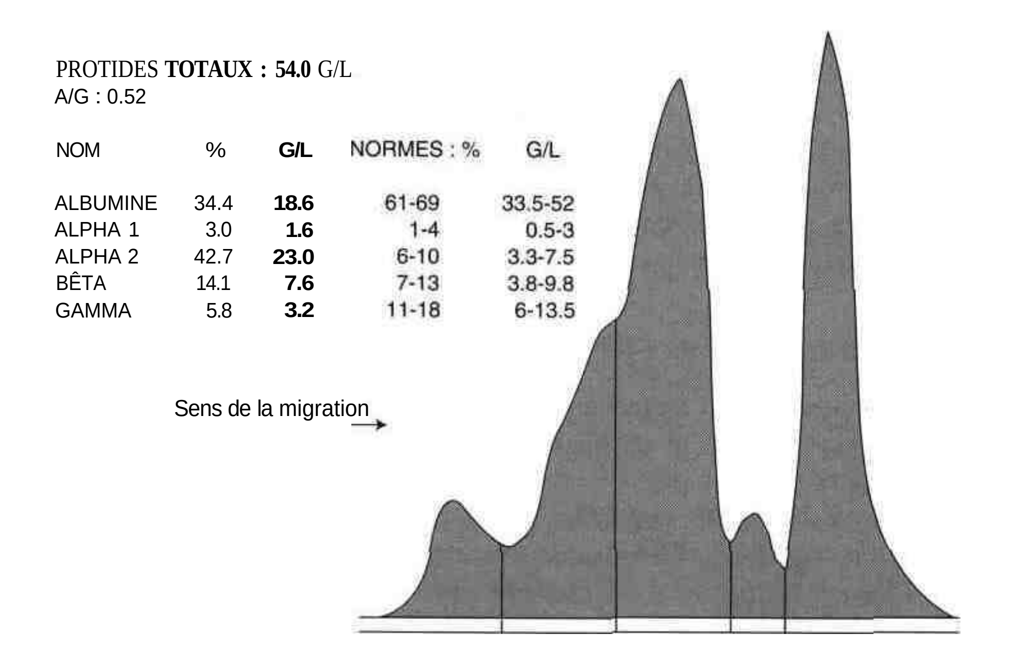


Figure 9.9 • Tracé d'un protéinogramme de syndrome néphrotique.

3.1.2.1. Hypo- ou agammaglobulinémies acquises

Les causes de diminution sont, comme ci-dessus pour l'albumine, les déperditions rénales ou digestives.

Quant aux défauts de synthèse on peut les voir lors des syndromes d'épuisement du système immunoformateur ou lors des thérapeutiques immunosuppressives (corticoïdes, ciclosporine).

3.1.2.2. Hypo- ou agammaglobulinémies primitives

D s'agit de déficits immunitaires spécifiques, touchant soit l'immunité cellulaire médiée par les lymphocytes T, soit l'immunité humorale et les lymphocytes B.

On décrit ainsi des **déficits immunitaires combinés sévères, d'origine génétique** souvent liés au sexe, et à ne pas confondre avec les **hypogammaglobulinémies transitoires de l'enfance.** Dans ce dernier cas, très fréquent, caractérisé par des infections ORL et trachéobronchiques à répétition, il s'agit d'un simple retard de la synthèse des immunoglobulines qui se corrigera après quelques injections de gammaglobulines ou spontanément, vers l'âge de 4 ou 5 ans. Le diagnostic sera fait, non sur l'électrophorèse ou l'immunoélectrophorise, trop grossières, mais sur le dosage spécifique des Ig G, Ig A et Ig M dont on appréciera le taux en fonction de l'âge.

3.2. Hyperprotéinémies — hyperglobulinémies

Les hyperprotéinémies sont toujours des hyperglobulinémies. Celles-ci atteignent souvent plusieurs familles de globulines simultanément, et sont donc plus « diffuses » que les dysglobulinémies monoclonales très localisées aux immunoglobulines et à un clone particulier de celles-ci. Nous distinguerons donc ces deux chapitres très différents de la pathologie.

3.2.1. Hyperglobulinémies diffuses et polyclonales

Elles s'observent très fréquemment dans des affections diverses et l'augmentation des globulines à l'électrophorèse affecte soit plusieurs zones, soit la zone gamma exclusivement :

- dans les **infections aiguës ou chroniques,** dans les infestations parasitaires, on note une élévation concomitante des α_2 et des "/-globulines. L'intensité de l'augmentation n'est pas proportionnelle à l'intensité de l'infection ni à la gravité de la maladie ;

- dans les **cirrhoses,** l'élévation des (S- et γ-globulines « en dos de chameau » est très caractéristique. Elle est due à l'augmentation des Ig A et Ig

M, qui dépasse celle des Ig G et qui se positionne à l'électrophorèse entre les P- et les •v-globulines ;

b - l'augmentation isolée des **γ-globulines** se présente à l'électrophorèse comme une courbe arrondie et étalée. Elle s'observe fréquemment dans les **infections,** les **maladies auto-immunes**, les **maladies allergiques** et particulièrement dans **l'asthme** où les Ig E sont augmentées sélectivement. Outre les Ig E totales, des Ig E spécifiques d'un grand nombre d'allergènes peuvent être dosées.

3.2.2. *Dysglobulinémies monoclonales*

Une dysglobulinémie monoclonale ou gammapathie monoclonale correspond à la synthèse d'une seule immunoglobuline par un clone cellulaire, d'origine lymphocytaire B ou plasmocytaire, en voie de multiplication anarchique. Elle correspond sur le tracé électrophorétique à une bande mince, étroite et très homogène, se traduisant sur la courbe densitométrique par un pic aigu et étroit, dit monoclonal, facile à déceler.

Plusieurs entités cliniques et biologiques sont bien définies : myélome plasmocytaire, macroglobulinémie, leucémies lymphoïdes chroniques, maladies des chaînes lourdes et gammapathies bénignes enfin.

3.2.2.1. Myélome plasmocytaire ou maladie de Kahler

Encore appelé myélome multiple des os, c'est une plasmocytose médullaire maligne d'une fréquence non négligeable.

- *La traduction clinique* est souvent pauvre au début, avec des douleurs osseuses, une altération de l'état général.
- *La radiologie* montre classiquement des géodes osseuses ou simplement parfois une déminéralisation diffuse.
- *Les signes biologiques* sont, par contre, très vite évocateurs avec des signes sanguins, des signes urinaires et des anomalies de la moelle osseuse.

Dans le sang, la vitesse de sédimentation est très élevée dépassant 100 ou 120 mm, la protéinémie est augmentée, parfois à 100 ou 120 g/1, la calcémie également par processus d'ostéolyse.

L'électrophorèse objective (figure 9.10) un pic monoclonal en zone gamma, l'immunofixation identifie une Ig G le plus souvent, parfois une Ig A ou D ou E. La protéine anormale peut être dosée et ses chaînes légères identifiées.

Dans les urines, la présence d'une *protéine de Bence-Jones* dite thermosoluble, car elle précipite aux alentours de 55 **°C** et se redissout lorsque la température continue à augmenter, est un bon élément en faveur de ce diagnostic. Elle est faite de dimères de chaînes légères K ou \ dont la synthèse est excédentaire par rapport aux chaînes lourdes. Son dépistage nécessite une électrophorèse des urines, concentrées si nécessaire et un typage immunologique.

Dans la moelle osseuse, la découverte de foyers myélomateux avec nappe plasmocytaire et cellules jeunes, de type plasmocytoblastes, signe le diagnostic.

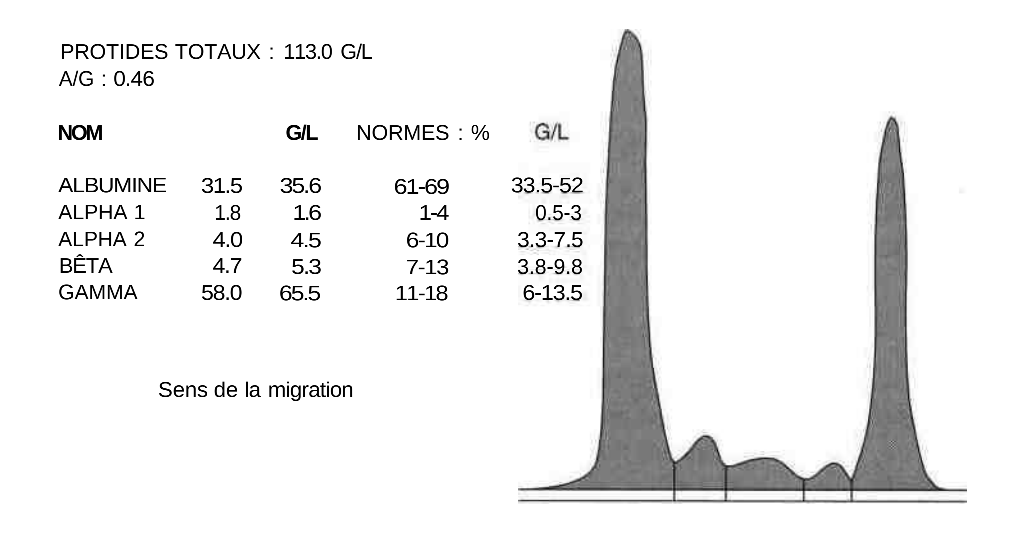


Figure 9.10 • **Tracé** électrophorétique d'un sérum de myélome avec pic monoclonal.

Le pronostic de la maladie n'est pas bon, la destruction osseuse étant régulière et invalidante malgré la chimiothérapie.

3.2.2.2. Macroglobulinémie de Waldenstrôm

C'est une hémopathie maligne, comme le myélome, mais la protéine monoclonale est une Ig M, expliquant le nom donné à cette affection.

• *Les signes cliniques* sont voisins de ceux évoquant la maladie de Kahler, si ce n'est l'âge, habituellement plus avancé, la présence de ganglions, de troubles de la coagulation et d'une anémie.

Les géodes osseuses, à l'emporte-pièce, typiques du myélome, sont ici rares ou absentes.

• *Les signes biologiques* sont moins riches :

• ***Dans** le sang,* la protidémie élevée est due à la macroglobuline monoclonale, identifiée par le dosage de cette fraction, par le pic en zone (3 de l'électrophorèse, par l'immunofixation.

• ***Dans les urines,*** la PBJ est beaucoup moins fréquente.

• ***Dans la moelle osseuse,*** une infiltration lymphoplasmocytaire, ou réticulolymphoïde caractérise la maladie.

3.2.2.3. Maladies des chaînes lourdes

Ce sont des dysglobulinémies rares, dans lesquelles les plasmocytes monoclonaux ont perdu la faculté d'associer normalement les chaînes lourdes et **légères. Les** chaînes lourdes, complètes ou incomplètes, circulent à l'état libre sous forme dimérisée ou polymérisée.

Il s'agit de chaîne a le plus souvent, rarement de chaînes -y, exceptionnellement de chaînes p..

La présence de chaînes lourdes a est volontiers notée dans les *lymphomes méditerranéens* observés chez des sujets jeunes du pourtour de la Méditerranée présentant une diarrhée continue avec, à l'électrophorèse du sérum, une bande large anormale en zone α_2 **ou** (3. À l'immunoélectrophorèse l'arc Ig A est déformé et épaissi.

3.2.2.4. Gammapathies monoclonales bénignes

Un pic monoclonal de type myélomateux est assez souvent découvert à l'électrophorèse du sérum de sujets âgés. Le diagnostic de myélome est alors envisagé mais la symptomatologie n'est pas complète et l'évolution ne la voit se compléter que dans 10 à 20 % des cas vers le myélome ou la maladie de Waldenstrôm.

Ces cas très particuliers, qui ont reçu le nom de dysglobulinémies bénignes, nécessitent cependant une *surveillance régulière de 3 mois en 3 mois* pour apprécier la variation du taux de la protéine anormale, Ig G le plus souvent.

Une dysglobulinémie de ce type est parfois notée à l'occasion d'infections **ou** de parasitoses chroniques.

4. Aperçu technologique sur les immunodosages

La réaction immunologique, basée sur la reconnaissance sélective d'un antigène par son anticorps, a donné naissance, depuis quelques années, à un très grand nombre de méthodes nouvelles.

Celles-ci peuvent être classées simplement **en trois** rubriques selon la manière dont on observe la réaction antigène-anticorps.

4.1. Étude directe des effets de la réaction antigène-anticorps

UU. *Méthodes de précipitation*

4.1.1.1. En solution

II s'agit des méthodes très classiques d'immunoturbidimétrie et d'immunonéphélémétrie qui reposent sur les phénomènes de diffusion de la lumière dans un milieu trouble, du fait de la précipitation antigène-anticorps.

- **La turbidimétrie** est identique à la photométrie d'absorption car on évalue la diminution d'intensité de la lumière incidente lorsqu'elle traverse le milieu trouble, la lumière transmise étant mesurée dans la même direction que la lumière incidente.

La plupart des automates de biochimie sont donc capables d'effectuer ces mesures.

- La néphélémétrie évalue la diffusion de la lumière sur les particules du milieu trouble, qui dépend de la taille des particules, de leur indice de réfraction, de la longueur d'onde de la radiation incidente, émise ou non par un laser. La lumière diffusée est mesurée dans une direction différente de celle de la lumière incidente, avec un angle variable suivant les appareils du commerce.

4.1.1.2. Diffusion ***en gel***

L'immunodiffusion simple peut être linéaire (Oudin) ou radiale (Mancini).

Dans **l'immunodiffusion radiale,** le diamètre de l'anneau de précipitation est proportionnel à la concentration de l'antigène et cette technique a été très populaire.

Immunodiffusion en gel après électrophorèse.

Il s'agit des techniques d'immunoélectrophorèse, simple ou bidimensionnelle, de l'électro-immunodiffusion selon Laurell ou encore de l'immunofixation. Toutes ces techniques associent un temps électrophorétique à une précipitation immunologique secondaire par diffusion ou simultanée dans la méthode de Laurell.

Celle-ci, en effet, réalise la migration électrophorétique dans une gélose imprégnée d'anticorps, entraînant la formation de pics ou « rockets » dont la hauteur, est proportionnelle à la concentration de l'antigène soumis à l'électro**phorèse.**

4.1.2. Méthodes d'agglutination

Ces méthodes sont souvent anciennes et sont très variées.

Elles consistent à revêtir une particule (hématie, grain de latex, micro-organismes) d'un antigène unique ou d'un complexe antigénique ou d'un anticorps et à observer l'agglutination produite par un réactif agglutinant lui-même très variable : anticorps, anticorps associé au complément, complément, antigène.

L'observation de l'agglutination peut être visuelle, photométrique ou par comptage de particules.

Un exemple typique de ces réactions est donné par les techniques de **détermination des groupes sanguins.**

L2. Étude de la réaction antigène-anticorps grâce au signal émis par un réactif marqué

2.1. Dosages en phase hétérogène. Mesure de la distribution du réactif marqué

Les molécules de réactif marqué sont réparties en deux compartiments selon qu'elles sont ou non engagées dans une réaction antigène-anticorps. Il sera donc nécessaire d'avoir *une étape de séparation physique* pour ne conserver que les molécules marquées liées, suivie d'une *deuxième étape de mesure du signal.* C'est donc bien la **distribution** du réactif marqué qui est étudiée.

Suivant la nature du marquage, on distingue :

4.2.1.1. Marquage isotopique

La radio-immunologie combine la sensibilité des mesures radioactives à la spécificité de la reaction immunologique.

Décrite pour la première fois par Berson et Yallow en 1962 à propos du dosage de l'insuline plasmatique, cette méthode *(radio-immuno assay* ou RIA) permet divers schémas réactionnels. À côté du schéma historique **par compétition,** on décrit en effet des méthodes « **sandwich** » par double ou simple capture.

Les techniques par compétition restent très classiques. Leur principe est le suivant :

Les antigènes marqués et non marqués entrent en compétition vis-à-vis des sites anticorps. Après incubation de durée variable, l'antigène radioactif qui ne s'est pas fixé sur les sites anticorps est séparé des complexes antigènes marqués -anticorps et éliminé.

La mesure de la radioactivité de la fraction liée est faite dans un compteur adapté, généralement y (cas de l'iode 125). L'isotope le plus utilisé pour marquer antigènes ou anticorps est en effet l'iode 125, émetteur γ et de période 60 jours. L'iodation des résidus de tyrosine des peptides et protéines est en effet relativement facile.

Permettant de mesurer des concentrations de l'ordre du **picogramme par ml,** cette technique a permis d'innombrables progrès en physiologie et médecine humaines. En France, cependant, elle n'est utilisable que par de rares laboratoires agréés, ce qui a considérablement limité son développement.

Le processus est représenté simplifié dans la figure 9.11.

4.2.1.2. Marquage emymatique

Les méthodes immunoenzymologiques ou EIA pour « *enzymo-immuno assay* » ont été les premières à remplacer les RIA pour certains dosages.

Ouvrant ainsi les techniques d'immunodosages en phase hétérogène (ELISA ou « enzyme-linked immunosorbent assay » à tous les laboratoires de biologie clinique, l'immunoenzymologie a donc aussi un intérêt historique.

Antigène + Anticorps + Antigène-^{125}I

Complexe antigène-Anticorps
Complexe antigène ^{125}**I-Anticorps**

Séparation
(forme libre-liée)

Mesure de la radioactivité liée dans un compteur γ

Figure *9.11* • Principe du dosage par compétition.

Comme pour la radioimmunologie en phase hétérogène, **une étape de séparation** de l'Ag lié à l'Ac de l'Ag libre est obligatoire. La méthode sandwich, utilisable si l'Ag à doser possède au moins deux sites antigéniques est souvent employée.

Les Ac en excès sont fixés sur une phase solide (comme la paroi du tube réactionnel) et ils fixent tous les Ag à doser dans l'échantillon. Après lavage on incube en présence **d'un deuxième Ac marqué par une enzyme (conjugué)** qui se fixe sur le deuxième site antigénique. Un deuxième lavage élimine le conjugué non lié et l'on ajoute le substrat pour développer la réaction enzymatique, elle-même observée par une réaction colorée facile à mesurer.

Les enzymes les plus utilisées sont :

- *La peroxydase du raifort.* Son substrat est l'ortho-phénylène diamine ou la triméthyl benzidine, en présence d'eau oxygénée.
- *La galactosidase d'E. coll.*
- *La phosphatase alcaline d'intestin de veau ou* ***d'E.*** **coli.**

Le principe réactionnel est représenté sur la figure 9.12.

4.2.1.3. Marquage par fluorescence

Les techniques d'immunofluorescence (FIA ou « fluorescence immunoassay ») sont basées sur la mesure de la fluorescence émise par le marqueur et permettent d'atteindre des seuils de détection voisins de ceux de la radioimmunologie.

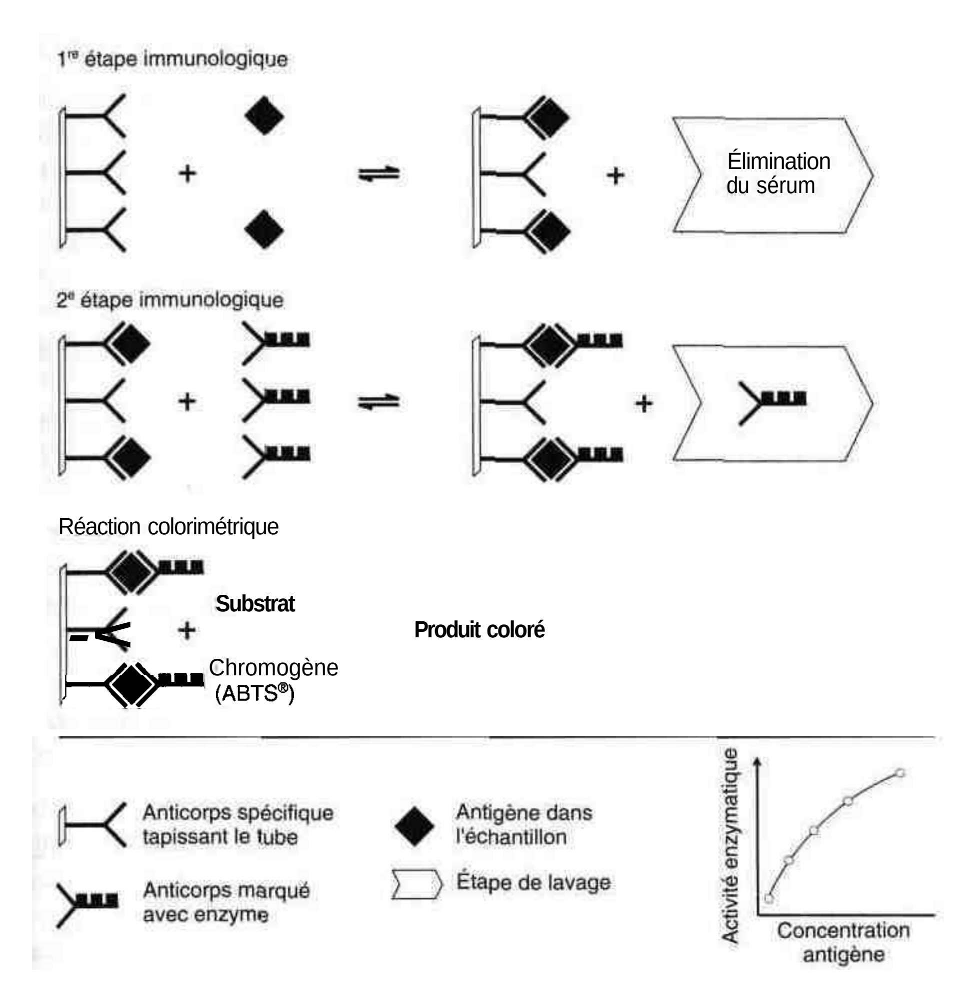


Figure 9.72 • Schéma réactionnel d'une technique enzymoimmunologique selon le principe « sandwich » (note d'information scientifique. Roche-Boehringer).

En phase hétérogène, les méthodes sont identiques aux précédentes.

Les différents **marqueurs fluorescents** ou fluorochromes sont :

- *l'isothiocyanate de fluorescéine ;*
- *les rhodamines ;*
- *les complexes à base de lanthanides (europium ou terbium)* qui ont une bande d'émission étroite, un indice de Stokes (différence entre la longueur d'onde d'excitation et celle d'émission) élevé et enfin une durée de vie d'émission longue de l'ordre de 50 à 1 000 *[is,* ce qui permet d'éviter les interférences dues au milieu biologique ;
- *les substrats enzymatiques fluorescents* où la fluorescence n'est révélée qu'après hydrolyse enzymatique du composé marqué.

4.2.1.4. *Marquage par luminescence*

La détection consiste ici en la mesure de l'intensité du rayonnement lumineux émis par **chimiluminescence,** à partir de molécules de synthèse, ce qui le différencie du phénomène de bioluminescence intervenant chez certains organismes vivants.

La lumière émise est issue d'une réaction chimique exergonique, lorsque le produit final de la réaction, oxydé, revient à son état fondamental.

Les traceurs peuvent être de deux types :

- *les traceurs directement luminescents* sont des conjugués d'aminobutylisoluminol (ABEI) ou d'esters d'acridinium ;
- *les traceurs enzymatiques* sont constitués par des dérivés de couplage d'Ac **ou** d'analytes avec une enzyme impliquée dans une *réaction de chimi- ou de bioluminescence.*

Il s'agit d'une production de lumière due à l'action d'une peroxydase sur le luminol ou grâce au système luciférase-luciférine de luciole, ATP dépendant et pouvant maintenant être fourni par génie génétique, en ce qui concerne la luciférase, et par synthèse chimique pour la luciférine.

4.2.2. *Dosages en phase homogène. Mesure par modulation de l'activité du réactif marqué*

Le réactif marqué va ici émettre un signal différent selon qu'il est engagé ou non dans une réaction antigène-anticorps. On observe donc une modulation du signal liée à la réaction Ag-Ac, qui peut s'apprécier sans qu'une séparation soit nécessaire, ce qui explique le nom de phase homogène.

On peut donc théoriquement espérer de ces méthodes une meilleure adaptation aux appareils avec automatisation plus aisée, éventuellement au prix d'interférences plus gênantes et d'une sensibilité de détection moins performante.

4.2.2.1. *Marque enzymatique*

Dans ces techniques, où il n'y a pas d'étape séparative, l'anticorps, en se fixant sur l'Ag ou l'haptène marqué agit en même temps sur **l'activité de l'enzyme** marqueur provoquant une augmentation ou une diminution d'activité.

Chaque molécule d'Ag marqué resté libre après la formation des complexes Ag-Ac, catalyse la transformation de nombreuses molécules de substrat et il y a **amplification de la réaction.**

Cette technique est appelée EMIT *(enzyme multiplied immunoassay technique).*

Les enzymes utilisées ici sont :

- le lysozyme du blanc d'œuf ;
- **la** glucose 6 phosphate déshydrogénase ;
- la malate déshydrogénase.

4.2.2.2. Marque fluorescente

Les méthodes les plus classiques sont :

- *la méthode utilisant* ***la protection de fluorescence*** avec deux Ac : l'un dirigé contre l'Ag à doser et l'autre dirigé contre l'Ag marqué non lié permettant sa neutralisation.

- ***la polarisation de fluorescence*** (FPIA ou « fluorescence polarization immuno assay »). Si l'on excite des molécules fluorescentes par une lumière polarisée et si l'on mesure l'intensité de lumière fluorescente dans les directions parallèle et perpendiculaire à la lumière incidente, on définit un taux de polarisation de la lumière de fluorescence.

Une décroissance de la polarisation de fluorescence est observée lorsqu'il y a compétition entre l'Ag marqué et l'Ag non marqué pour les sites de liaison sur l'Ac et cela se prête aisément à la mesure.

4.2.3. Techniques de localisation microscopique

II s'agit de techniques très particulières (immunoenzymologie cellulaire, immunofluorescence à l'examen microscopique, analyse et comptage de particules fluorescentes par cytofluorimétrie de flux) rentrant dans le cadre des études microscopiques en anatomie pathologique ou parasitologie par exemple. Ces techniques ne seront pas abordées ici.

4.3. Observation d'un effet biologique de la réaction immunitaire

II peut s'agir de **lyse cellulaire** observée sur des hématies, sur des lymphocytes, sur des micro-organismes ou sur des liposomes.

Il peut aussi être question de **mobilité cellulaire** étudiée par exemple lors des tests d'immobilisation des spermatozoïdes ou du test d'inhibition de la migration des macrophages.

Parfois ce sont des **études de différenciation ou de modification cellulaires** comme le test de transformation blastique des lymphocytes ou le test de dégranulation des polynucléaires basophiles.

Le grand nombre de ces tests, leur défaut de **spécificité expliquent le manque** d'engouement actuel pour ces analyses.

Références bibliographiques

ASSIM (Association des Enseignants d'Immunologie des universités de langue française), *Immunologie générale,* Medsi/ Mcgraw-Hill, Pparis, 1991.

J.P. Borel et Al., *Comment prescrire et interpréter un examen de biochimie,* Maloine, Paris, 1984.

M. Charrel, *Sémiologie biochimique.* Ellipses, Édition Marketing, Paris, 1991.

Laboratoire Cerba, *Les marqueurs tumoraux,* Collection Quid Novi n° 1, Cergy-Pontoise, 1988.

R. Masseyeff, *Propositions pour une classification et une terminologie de l'immunoanalyse. Instrumentation en biochimie clinique,* commission Instrumentation de la SFBC, Expansion Scientifique Française, Paris, 1989.

Professeurs et enseignants de biochimie, *Ouvrage destiné aux internes du DES de Biologie médicale,* **tome** 2, **Toulouse, 1991.**

L. Stryer, *Biochemistry,* 4th édition, W.H. Freeman and Company, New York, 1995.

G. Lefevre, H. Graine. *Les nouveaux marqueurs de la nécrose cardiaque : aspects analytiques et diagnostiques.* Option Bio, 24 juillet 1998. supplément au numéro 211.212.

G. Lefevre. *Les troponines : aspects biologiques et cliniques.* Annales de Biologie Clinique, 2000 ; 5 : 39-48.

10

Enzymes plasmatiques

France de La Farge

La mesure de l'activité des différentes enzymes du sérum humain a pris depuis quelques années une grande importance. Ces enzymes se trouvent normalement dans le sérum en faible quantité et à des taux bien déterminés. Dès qu'un organe ou un tissu est lésé, il libère dans la circulation générale des enzymes qui lui sont propres. Par exemple, pour déterminer l'organe lésé au lieu de faire une biopsie d'organe il est beaucoup plus facile et confortable pour le malade d'effectuer une prise de sang.

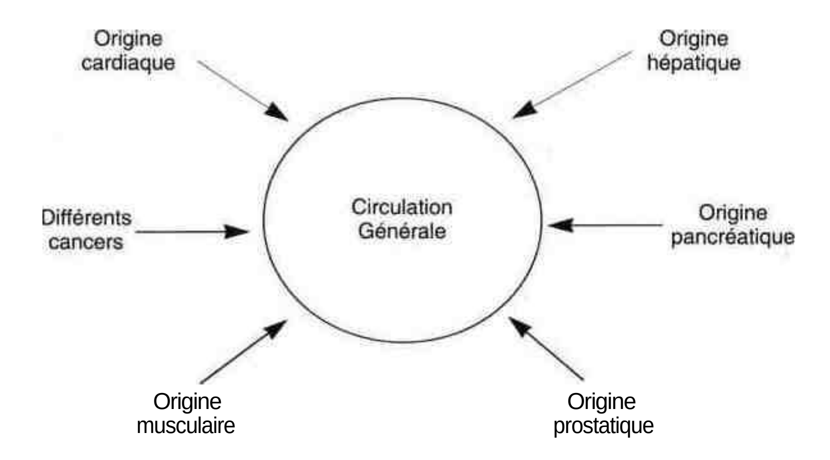


Figure 10.1 • Origine des différentes enzymes présentes dans le sérum humain.

Les enzymes que l'on retrouve dans le sérum proviennent du foie, du cœur, du pancréas, de la prostate et des muscles.

L'intérêt de la détermination des enzymes est multiple :

- il permet de déceler une maladie avant même qu'elle ne soit cliniquement percevable ;
- il permet de préciser l'organe lésé ;
- et enfin pour certaines enzymes leur taux est un bon marqueur de l'évolution de la maladie.

Les maladies moléculaires font également appel à l'enzymologie. Ainsi, les déficits enzymatiques d'origine génétique peuvent-ils, bien entendu, être décelés ou confirmés grâce aux méthodes générales de l'enzymologie.

On exprime les activités enzymatiques **en** « Unités Internationales » UI ou U/l.

Une **unité internationale** correspond à la *quantité d'enzyme qui transforme dans des conditions optimales bien définies (température, pH, quantité de substrat), une micromole de substrat par minute.*

1. Classification des enzymes plasmattques

Le nom donné à une enzyme est basé sur la spécificité d'action et de substrat. Il existe des règles strictes de nomenclature. Dans un premier temps des noms proches de l'organe dans lequel on les trouvait, ont été utilisés. Ainsi la pepsine (enzyme du suc gastrique) vient de peptique, relatif à la digestion. Ensuite on a ajouté le suffixe « ase » au substrat qu'elles dégradaient : l'uréase dégrade l'urée et l'uricase l'acide urique. Pour commencer à rationaliser le nom des enzymes, on a tenu compte du nom du substrat et du type de réaction auquel on ajoutait le suffixe « ase ». C'est le cas de :

- la phosphofructo-kinase ;
- la pyruvate-kinase ;
- et de la L-lactate-déshydrogénase par exemple.

L'Union internationale de biochimie a un registre de toutes les enzymes, une numérotation et une classification officielle.

Cette numérotation comprend 4 chiffres.

Le premier désigne **la classe** de l'enzyme qui dépend du type de réaction catalysée :

1. Oxydo-réductases (transfèrent des électrons).
2. Transférases (transfèrent des atomes ou des groupes d'atomes).
3. Hydrolases (coupent des liaisons en ajoutant une molécule d'eau).
4. Lyases (coupent des liaisons : carbone - carbone ; carbone - oxygène par d'autres moyens que l'oxydation ou l'hydrolyse).
5. Isomérases (catalysent l'isomérisation).

6. Ligases (forment des liaisons entre un carbone et un métalloïde en utilisant l'énergie fournie par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP).

Le second chiffre désigne la **sous-classe** de l'enzyme, qui est définie selon le mécanisme de la réaction. Ainsi par exemple, les déshydrogénases transfèrent des atomes d'hydrogène.

Le troisième chiffre désigne la **nature de la molécule servant d'accepteur.**

Le quatrième enfin, représente le **numéro d'ordre de l'enzyme** dans le sous groupe.

Exemple : la L-lactate déshydrogénase a pour numérotation : EC 1.1.1.27.

1.1. Enzymes spécifiquement plasmatiques

Les enzymes spécifiquement plasmatiques sont des composants habituels et fonctionnels du plasma. Elles sont présentes à un taux constant maintenu par la production active d'un ou plusieurs organes.

Quelques exemples peuvent être donnés :

1.1.1. Céruléoplasmine

La céruléoplasmine est une **enzyme d'oxydation** portant du cuivre. Le cuivre y est fortement lié et il est impossible de le séparer sans dénaturer la protéine. Il y a 8 atomes de cuivre sur chaque molécule de céruléoplasmine, ce qui lui confère la couleur bleue des sels de cuivre lorsqu'elle est purifiée.

Au cours de l'inflammation, l'interleukine 1 stimulerait de façon spécifique la transcription et la traduction de gènes codant principalement les **protéines plasmatiques de la phase aiguë,** donc de la céruléoplasmine. Le taux sanguin de la céruléoplasmine augmente rapidement dans l'inflammation.

1.1.2. Lipoprotéine lipase

Elle est produite, à la surface de l'endothélium capillaire, par les **cellules endothéliales.** Elle hydrolyse les trigycérides des chylomicrons et des VLDL, libérant leurs acides gras. C'est le facteur clarifiant du plasma.

1.1.3. Enzymes de la coagulation et de lafîbrinotyse

Elles sont également spécifiques du plasma où elles exercent leur fonction particulière dans la cascade réactionnelle de **l'hémostase** ou de la **Hbrinolyse.**

Elles sont synthétisées par le foie expliquant que, lorsque la capacité de syn- ; thèse de l'hépatocyte diminue, l'activité plasmatique de ces enzymes diminue ssi. Leur détermination fera partie de l'exploration fonctionnelle hépatique.

1.2. Enzymes non spécifiquement plasmatiques

Ce sont des enzymes simplement véhiculées dans le sang, n'ayant pas de fonction plasmatique évidente, et présentes normalement à un taux faible.

On peut distinguer :

1.2.1. Enzymes d'excrétion

Ces enzymes sont synthétisées par des **glandes exocrines.**

Citons par exemple les enzymes suivantes :

- Phosphatase acide de la prostate ;
- Phosphatase alcaline du foie ;
- Amylase du pancréas ;
- Lipase du pancréas.

1.2.2. Enzymes cellulaires

Les enzymes cellulaires appartiennent à tous les métabolismes et leur nombre est considérable. Certaines ont une localisation très particulière dans certains **tissus.**

On peut ainsi identifier l'organe d'où proviennent les enzymes dont les taux sériques sont modifiés.

En comparant les résultats obtenus pour les enzymes qui passent rapidement dans le plasma et qui ont une durée de vie courte (CK, TGO) et pour les enzymes qui ont une longue durée de vie et qui passent moins rapidement dans le sérum (TGP et a HBDH), on peut déterminer la phase d'une affection aiguë.

2. *Problèmes rencontrés en enzymologie clinique*

2.1. Spécificité d'organe

L'idéal serait de rencontrer pour chaque organe, une enzyme spécifique produite uniquement par cet organe. Ainsi l'omithine carbamyl transférase (OCT) a une origine hépatique stricte et elle est donc un **marqueur très spécifique de l'atteinte de l'hépatocyte.**

Ce n'est malheureusement pas souvent le cas.

Toutefois l'étude de la répartition des **isoenzymes** dans différents organes permet de retrouver une meilleure spécificité d'organe. Ainsi, la L-lactate déshydrogénase qui peut provenir du foie, du cœur, des reins, des globules rouges, a une isoenzyme spécifique du cœur, LDH 1 ou aHBDH. Son dosage présente donc un grand intérêt. De même, la créatine kinase (CK), enzyme musculaire, possède une isoenzyme, la $\mathbf{CK_{MB}}$ d'origine myocardique.

Les enzymes libérées dans le plasma sont ensuite catabolisées ou éliminées.

La concentration sérique d'une enzyme à un moment donné dépend de l'équilibre entre deux facteurs : la libération cellulaire et le catabolisme de la protéine. On peut donc définir une *demi-vie* dans le sérum qui est variable d'une enzyme à l'autre. Ainsi, après un infarctus du myocarde, le taux de la **CK_{MB}** (demi-vie 12 à 15 h) se normalise plus vite que celui de **l'αHBDH** (demi-vie 50 à 120 h).

Tableau 10.1 • Demi-vie de quelques enzymes plasmatiques.

TGO	17	+	5 heures
TGP	47	±	10 heures
LDH1(a HBDH)	113	+	60 heures
LDH5	10	j;	2 heures
CK			env. 15 heures
Phosphatase alcaline	3	–	7 jours
γGT	3	–	4jours
Amylase	3	–	6 jours
Lipase	3	–	6 heures

2.2. Expression des résultats

La vitesse d'une réaction catalysée par une enzyme dépend de nombreuses conditions expérimentales : concentration en enzyme, nature et concentration du ou des substrats, température, pH, présence d'activateurs. Les conditions idéales pour la mesure d'une activité enzymatique ne devraient dépendre que de la concentration en enzyme. La méthode est alors dite *optimisée.*

Selon les méthodes conventionnelles utilisées depuis des années, avec des conditions réactionnelles non optimales, la comparaison des résultats d'un laboratoire à l'autre n'est guère possible.

La modification des concentrations des substrats et des coenzymes, du tampon, du pH, de la température, ainsi que l'utilisation d'activateurs permettent d'obtenir des activités plus élevées ; en même temps on se rapproche de la condition requise dans la définition de l'unité internationale, en vue d'obtenir la meilleure standardisation possible.

2.2.1. Unité internationale

Une unité internationale correspond à la quantité d'enzyme qui catalyse la transformation d'une micromole de substrat par minute, dans des conditions optimales de concentration en substrat, de pH et à une température définie.

Dans les liquides biologiques, les résultats sont exprimés en unités internationales (UI) ou en unités par litre (U/l). Une nouvelle unité doit remplacer l'unité internationale, le katal.

Un katal définit l'activité catalytîque permettant la conversion d'une mole de substrat par seconde dans les conditions opératoires définies ci-dessus.

En pratique dans les liquides biologiques, on est amené à retenir le nanoKatal.

(1 U/l = 16,67 nKat/1).

L'unité internationale, malgré son nom, ne résout malheureusement pas tous les problèmes.

2.2.1.1. Problèmes de température

En ce qui concerne la température, la Société allemande de chimie clinique conseille 25 °C, la Société française de biologie clinique (SFBC) propose des normes à 30 °C et les États-Unis 37 °C. Il est important de noter les différences de valeurs usuelles obtenues en fonction de la température. Il existe toutefois des facteurs de conversion pour passer d'une température à l'autre.

Le tableau 10.2 montre les grandes différences obtenues en fonction des différentes températures.

Tableau 10.2 • Valeurs usuelles sériques obtenues pour quelques enzymes (en U/l) par des méthodes optimisées à différentes températures.

		25 °C	30 °C	37 °C
Amylase		6-30	7-37	10-55
Créatine Kinase	Homme	10-80	15-130	25-195
	Femme	10-70	15-110	25-170
γGT		6-24	8-33	11-43
LDH		100-240	140 - 330	200-480
ccHBDH		55-145	70 - 190	80 - 220
5' Nucléotidase		< 3	<;5	2=9
Phosphatases acides			=£7	≤ 10
Phosphatases alcalines	Enfant	110-720	145-950	180-1 200
	Adulte	60-170	80-220	100-290

2.2.1.2. *Problèmes de substrat*

Nous prendrons comme exemple les **phosphatases alcalines** pour montrer que l'activité enzymatique d'une même enzyme est très différente d'un substrat à l'autre. De nombreuses méthodes, utilisant différents substrats, ont ainsi vu le jour et donné des résultats exprimés en unités suivies du nom de l'auteur qui avait proposé la technique (exemple : méthode de Bodansky, exprimée en unités Bodansky).

La technique de Bodansky utilise le p-glycérophosphate comme substrat. Après coupure du glycérol et du phosphate par la phosphatase alcaline, on termine par un dosage du phosphate à 37°. Les valeurs usuelles sont alors 1 à 4 unités Bodansky, ce qui correspond à 18 et 27 U/l.

La technique de King et Armstrong utilise le phénylphosphate à 37° comme substrat et dose le phénol formé. Les valeurs usuelles, selon King et Armstrong, sont de 4 à 12 U K.A., dont la correspondance avec les U/l est donnée dans le tableau 10.3.

Tableau 10.3 • Correspondance des unités Bodansky, King Armstrong et Bessey Lowry en U/l.

Méthodes utilisées	Valeurs usuelles	Valeurs usuelles transformées en U/l
Méthodes optimisées	**30-126 U/l**	**30-126 U/l**
Bodansky	**1-4 UB**	**18-27 U/l**
King Armstrong	**4-12 UKA**	**10-46 U/l**
Bessey Lowry	1,2-6 UBL	**30-100 U/l**

La méthode de Bessey Lowry a pour substrat du paranitrophénylphosphate qui sera transformé par la phosphatase en paranitrophénol dont on dosera la coloration jaune au spectrophotomètre.

Le tableau 10.3 montre bien que l'expression des résultats en U/l n'apporte aucune standardisation si la technique utilisée n'est pas mentionnée.

2.2.2. *Principe général de la mesure d'une activité*

Pour déterminer l'activité enzymatique d'une enzyme on utilise la réaction catalysée par l'enzyme et l'on dose la quantité de produit formé ou la quantité de substrat détruite au cours d'un temps déterminé (la minute).

Nous pouvons pour cela utiliser des méthodes colorimétriques en **point final** comme c'est le cas dans la méthode Bodansky ou bien utiliser **la cinétique** d'apparition du produit comme dans la méthode de Bessey Lowry.

Enfin bien souvent, on essaie d'introduire **un coenzyme nicotinique,** soit dans une réaction directe, comme c'est le cas pour la détermination de la lacticodéshydrogénase (LDH), soit en utilisant une cascade de réactions afin de terminer par une réaction utilisant le couple NAD"^{1}", NADH,H^+ ce qui est le cas de la détermination de l'aspartate amino-transférase (ASAT), ou le couple NADP^{4}", NADPH,H^{1}' pour la détermination de l'activité catalytique de la créatine kinase (CK).

2.2.2.1. Méthode calorimétrique en point final

Exemple : phosphatases alcalines déterminées par la méthode de Bodansky.

Les phosphatases alcalines agissent sur le (3 glycérophosphate pour le transformer en glycérol et acide phosphorique. Le dosage en point final des phosphates produit une coloration proportionnelle à la quantité de phosphatases alcalines dans le sérum.

2.2.2.2. *Méthode calorimétrique en cinétique*

Exemple : phosphatases alcalines déterminées par la méthode de Bessey Lowry.

Cette méthode peut être réalisée aussi bien en point final qu'en cinétique. Elle utilise la réaction suivante, en milieu alcalin :

Paranitrophényï phosphate + H_2O $\xrightarrow{\text{Phosphatase}}$ paranitrophénol + acide phosphorique

La vitesse de formation du paranitrophénol est proportionnelle à la quantité d'enzyme dans le sérum.

2.2.2.3. *Détermination de l'activité aspartate 2 oxoglutarate aminotransférase TGO ou ASAT (aspartate aminotransférase) selon les recommandations de la SFBC*

Les deux réactions suivantes sont couplées :

1) L-aspartate + a-cétoglutarate $\xleftrightarrow{\text{TGO}}$ oxaloacétate + L-glutamate

2) Oxalaoacétate + $NADH,H^+$ $\xleftrightarrow{\text{MDH}}$ L-malate + NAD^+

MDH = Malate déshydrogénase. a-cétoglutarate = 2 oxoglutarate

Deux temps peuvent être distingués :

- mise en température des réactifs et *élimination des réactions parasites* (ici consommation de l'oxaloacétate présent dans l'échantillon) ;

- *déclenchement de la réaction par addition de 2 oxoglutarate et mesure de la vitesse de diminution de l'absorbance à 340 nm* (cinétique décroissante) après que l'équilibre entre les deux réactions ait été atteint.

Les méthodes cinétiques utilisant le couple NAD^+, $NADH, H^+$ sont aujourd'hui très employées en chimie clinique pour déterminer des activités enzymatiques.

2.2.3. *Standardisation des méthodes de mesure d'activité enzymatique*

L'utilisation des méthodes recommandées par la Société française de biologie clinique (SFBC) pour mesurer la concentration catalytique des différentes

enzymes dans le sérum doit contribuer à l'amélioration des résultats en permettant une meilleure précision et conduire à une appréciation standardisée de la concentration catalytique de ces enzymes dans les laboratoires de biochimie clinique.

L'idéal serait que tous les laboratoires utilisent *le même substrat,* les mêmes activateurs de reaction, le même pH et *la même température.* À ce moment-là seulement les résultats pourront être comparés.

p. *Principales enzymes d'intérêt clinique*

3.1. Phosphatases

Les phosphatases sont des phosphomonestérases qui coupent la liaison ester phosphorique par hydrolyse en libérant de l'acide phosphorique. Ainsi par exemple :

Glucose 6-Phosphate + H_2O ——Glucose 6 phosphatase——> glucose + acide phosphorique

Le pH optimum de ces phosphatases varie selon l'origine organique de l'enzyme. Il existe dans le sérum deux types de phosphatases. Les phosphatases qui agissent à pH acide et les phosphatases qui agissent à pH alcalin. Cela explique leur dénomination.

3.1.1. Phosphatases alcalines

3.1.1.1. Rôle

Les phosphatases alcalines sont des enzymes dimériques de type métalloglycoprotéique. Ce sont des phosphomonoestérases de type I, leur activité optimale est comprise entre pH 7,5 et pH 9,6.

Ces enzymes se trouvent dans de nombreuses cellules en particulier dans les zones de croissance des os, la muqueuse intestinale, le rein, le foie, le cerveau, les leucocytes. Leur élimination se fait par la bile.

3.1.1.2. Valeurs usuelles

- Adultes: ***30 à 125*** *Vfl.*
- Enfants : *110 à 400 U/l* (technique au paranitrophénylphosphate, cinétique à 37°).

3.1.1.3. Variations pathologiques

Des augmentations des phosphatases alcalines **sont observées dans les** affections hépatiques et les affections osseuses.

> AFFECTIONS HÉPATIQUES

L'augmentation des phosphatases alcalines est un *signe de cholestase.*

Tout ictère avec un taux de phosphatases alcalines normal doit faire penser à une cirrhose, une hépatite ou une hémolyse.

L'évolution du taux de bilirubine est différente de celle des phosphatases alcalines. La dissociation phosphatases alcalines élevées et bilirubine normale est un signe de cancer secondaire du foie.

En revanche, lorsqu'un ictère se traduit par une forte augmentation des phosphatases alcalines et une augmentation modérée du taux des transaminases, il faut penser à un ictère par rétention.

Les phosphatases alcalines sont augmentées dans les cancers primitifs du foie et lors des calculs des voies biliaires.

▶ AFFECTIONS OSSEUSES

Les phosphatases alcalines sont *augmentées* dans les affections suivantes :

- *La maladie de Paget.* Les taux de phosphatases alcalines peuvent être 20 à 30 fois plus élevés que la normale. Cette indication est importante au début de la maladie lorsque les signes radiologiques ne sont pas encore visibles.
- *Les ostéomalacies et le rachitisme.*
- *Les tumeurs osseuses.*
- *Les leucoses et la maladie de Hodgkin.*

On note par contre une ***hypophosphatasémie*** dans les maladies suivantes :

- *Les hypophosphatasémies congénitales.*
- *L'hypoparathyroïdie.*
- *L'ictère hémolytique.*

3.1.1.4. *Détermination de l'activité enzymatique des phosphatases alcalines*

Les phosphatases alcalines catalysent *l'hydrolyse du paranitrophénylphosphate* (PNPP) en paranitrophénol et acide phosphorique. Le paranitrophénol (PNP) de coloration jaune est libéré proportionnellement à l'activité de la phosphatase et est mesuré par photométrie en milieu alcalin.

$$PNPP + H_2O \xrightarrow{\text{phosphatase alcaline}} PNP + PO_4H_3$$

La différenciation des activités d'origine osseuse et d'origine hépatique peut se faire en utilisant *la thermosensibilité de la fraction osseuse* à 56 °C pendant 10 minutes.

3.1.2. Isoenzymes des phosphatases alcalines

La séparation des isoenzymes des phosphatases alcalines est particulièrement difficile. Elle se fait habituellement par électrophorèse qui différencie difficilement les fractions hépatiques des fractions osseuses. Seul le support « IsoPAL » permet de les séparer selon le schéma de la figure 10.2.



Figure 10.2 • Électrophorèse des isoenzymes des phosphatases alcalines
A = diverses fractions théoriques.
B = tracé à l'état normal.

La répartition physiologique des isoenzymes chez. un individu sain est la suivante :

- fraction osseuse 50 à 70 % ;
- fraction hépatique 30 à 50 %. Ces deux fractions sont les plus importantes ;
- fraction intestinale 0 à 20 %. Cette fraction est inconstante.

L'enfant a, jusqu'à l'adolescence, une prédominance de l'isoenzyme osseuse qui peut atteindre 90 % et qui va, bien entendu, de pair avec l'élévation physiologique du taux des phosphatases alcalines sériques.

Les différentes formes retrouvées dans le sérum sont codées par *trois gènes différents.*

3.1.2.1. Isoenzymes normalement présentes dans le plasma humain

Ces isoenzymes sont constituées essentiellement de *la forme hépatique H_1 et de la forme osseuse*, codées par un gène « aspécifique » que l'on retrouve dans l'os et dans le foie.

Une troisième forme macromoléculaire (appelée encore *fraction hépatique rapide*, biliaire, extra-hépatique ou H_2) correspondrait à des molécules de phosphatases alcalines, associées à des fragments de membrane hépatique. Cette isoforme a des mobilités électrophorétiques variables, selon le support : elle peut être très rapide sur acétate de cellulose, et beaucoup plus lente sur agarose (d'où sa terminologie différente). Sa présence est significative d'une pathologie qui

peut être non cancéreuse (cholestase) ou cancéreuse avec ou sans métastase hépatique.

3.1.2.2. Isoenzyme d'origine intestinale

L'isoenzyme intestinale est codée par un gène s'exprimant dans l'épithélium intestinal.

Cette forme est exempte d'acides sialiques, et présente chez 15 à 20 % des individus, plus particulièrement ceux dits sécréteurs des groupes sanguins 0 et B. On peut trouver jusqu'à trois fractions sur support d'agarose.

3.1.2.3. *Isoenzyme* ***d'origine placentaire***

Habituellement absente chez les sujets normaux, cette ***isoenzyme*** *placentaire* est trouvée dans le placenta de la femme enceinte à partir du 4e mois de la grossesse et jusqu'au terme.

On peut retrouver une forme placentaire associée (dite *placenta], like* PALP) dans le sérum de certains patients cancéreux (cancers de l'ovaire, du col de l'utérus, du poumon). Elle est appelée *isoenzyme de Regan.*

Une autre forme associée ou *isoenzyme de Nagao* a été trouvée dans certaines tumeurs (testicule, thymus).

Ces deux dernières formes pathologiques se différencient de la fraction placentaire par leurs propriétés immunologiques.

Il existe enfin une *autre forme dite intestinale fœtale.* C'est une enzyme hétéromère qui s'exprime au niveau de l'intestin du fœtus jusqu'à 25 et même 32 semaines de gestation (et peut-être dosée dans le liquide amniotique). Elle est composée de deux isoformes d'origine intestinale et placentaire. Elle possède donc les propriétés biochimiques à la fois des isoenzymes intestinale et placentaire.

3.1.3. *5' nucléotidase*

La 5' nucléotidase a une localisation hépatique prépondérante bien qu'on puisse la retrouver dans beaucoup d'autres tissus. Dans l'hépatocyte, elle se trouve au niveau des membranes, fonctionne à pH alcalin et a pour substrat les nucléotides phosphorylés en position 5' du pentose.

Les **valeurs usuelles** sont inférieures à *9 Vil.*

Cette enzyme est spécifique de la pathologie hépatobiliaire. Elle augmente au cours des cholestases intra ou extra-hépatiques.

Une dissociation entre les phosphatases alcalines élevées et un taux normal **de** 5' nucléotidase oriente vers une affection d'origine osseuse. Dans ce cas la séparation électrophorétique des isoenzymes de la phosphatase alcaline permet de lever l'ambiguïté.

3.1.4. Phosphatases acides

3.1.4.1. Rôle

Les phosphatases acides sont des phosphomonoestérases de type II, leur activité optimale se trouve comprise entre pH 4,5 et pH 6. Les phosphatases acides se trouvent dans les tissus suivants : prostate, foie, rein, rate, globules rouges.

Le taux sérique des phosphatases acides totales n'est guère différent chez l'homme et chez la femme, ce qui prouve qu'à l'état normal la phosphatase acide d'origine prostatique passe peu dans le sérum. L'activité phosphatasique acide du sérum provient surtout des érythrocytes ou des os.

3.1.4.2. Valeurs usuelles

Phosphatases acides totales : ***2 à 10*** *VU.*

Phosphatase acide prostatique : *< 3,5 VU* (Technique au p. nitrophénylphosphate, cinétique à 37 °C).

Elle est déterminée de façon indirecte après inhibition de son activité par le tartrate à pH 5 ou par dosage spécifique immunologique.

3.1.4.3. Variations pathologiques

Les phosphatases acides augmentent fortement dans **les cancers de la prostate** en particulier avec métastases osseuses.

Cependant leur manque de spécificité leur fait préférer d'autres marqueurs : ainsi actuellement le marqueur PSA **(antigène spécifique de la prostate)** est plus intéressant ; il permet parfois de déceler une pathologie tumorale avant que la clinique ne puisse le faire (cf. Marqueurs tumoraux, chapitre 9).

3.2 Transaminases

Les transaminases permettent le transfert du groupement aminé d'un acide aminé sur un acide a cétonique. L'acide aminé est alors transformé en acide a cétonique correspondant et l'acide a cétonique en acide aminé.

Les deux principales réactions de transamination sont catalysées par les transaminases TGO ou ASAT et TGP ou ALAT.

3.2.1. Transaminase glutamo oxaloacétique ou L-aspartate : 2 oxoglutarate aminotransférase

3.2.1.1. Rôle

i La transaminase glutamo-oxaloacétique ou TGO ou ASAT (aspartate aminotransférase) catalyse la réaction suivante :

Acide glutamique + Acide oxaloacétique $\xleftrightarrow{TGO}$ acide α cétoglutarique + acide aspartique.

La TGO est essentiellement présente dans le cœur, mais on la trouve aussi dans le foie, le rein et les muscles.

3.2.1.2. Valeurs usuelles

***5 à 40** U/l* (Cinétique UV à 37 °C).

3.2.1.3. Détermination de l'activité enzymatique de la TGO

Les mesures sont effectuées à l'aide de réactions couplées pour permettre l'utilisation du coenzyme NADH,H"1", dont on mesure la diminution d'absor- **bance.**

La TGO catalyse la reaction :

L-aspartate + 2 oxoglutarate $\xrightarrow{TGO}$ oxalo acétate + L-glutamate cette réaction est couplée avec la réaction suivante :

Oxalo acétate + NADH + H+ $\xrightarrow{MDH}$ L-malate + NAD^+.

La vitesse d'oxydation du NADH est proportionnelle à l'activité catalytique de la TGO. Elle est déterminée par mesure de la diminution de l'absorbance à 340 nm.

3.2.2. Transaminase glutamo-pyruvique ou alanine amino-transférase

3.2.2.1. Rôle

La transaminase glutamo-pyruvique (TGP) est encore appelée alanine amino transférase (ALAT). Elle est essentiellement présente dans le foie mais on la trouve aussi dans le cœur, le rein.

La TGP catalyse la réaction suivante :

Acide glutamique + acide pymvique $\xrightarrow{TGP}$ acide a cétoglutarique + alanine.

***3.2.2.2.** Valeurs usuelles*

***5 à 55** U/l* (Cinétique UV à 37 °C).

3.2.2.3. Détermination de l'activité enzymatique de la TGP

À l'exception de la température, les différentes sociétés scientifiques, SFBC (Société française de biologie clinique), IFCC (International fédération of clini-

cal chemistry societies) et SSCC (Société suisse de chimie clinique) recommandent les mêmes conditions de réactions.

Les réactions sont toujours couplées afin de permettre l'utilisation du NADH:

$$\text{L-Alanine} + 2\ \text{oxoglutarate} \xrightarrow{\text{TGP}} \text{pyruvate} + \text{L-glutamate.}$$

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{L-lactate} + \text{NAD}^+.$$

La vitesse d'oxydation du NADH est proportionnelle à l'activité catalytique de la TGP. Elle est déterminée par mesure de la diminution d'absorbance à 340 nm.

3.2.3. Variations pathologiques des transaminases

3.2.3.1. Affections cardiaques

La mesure de l'activité des transaminases est très utile pour le diagnostic de **l'infarctus du myocarde.**

L'évaluation de la TGO y est la plus importante. Mais, bien que la TGP ait un rôle moins grand puisque d'origine principalement hépatique, une augmentation de la TGP et de la TGO donne une indication du degré de l'atteinte hépatique éventuelle, pouvant être consécutive à une insuffisance cardiaque post-infarctus.

Lors d'un infarctus du myocarde, ***l'augmentation de la TGO commence à la 6e heure, se poursuit jusqu'à la 36e heure et retourne à la normale au bout de 5 à 6 jours.***

On trouve également une augmentation des TGO dans **les embolies pulmonaires et les infarctus rénaux.**

f *3.2.3.2. Affections hépatiques*

Dans les affections hépatiques, la demande d'analyse n'est pas limitée à une transaminase mais aux deux, TGO et TGP.

Dans les **hépatites aiguës,** l'augmentation des TGO mais surtout des TGP commence avant même que l'ictère ne soit déclaré.

L'augmentation du taux des TGP signe en *effet* ***une cytolyse hépatique*** qui permet de suivre l'évolution de la maladie et une rechute éventuelle.

L'augmentation des transaminases est le seul signe biologique des hépatites anictériques.

Dans les **hépatites chroniques,** l'augmentation des transaminases est modérée, elle traduit l'atteinte parenchymateuse par nécrose cellulaire.

Les obstructions des voies biliaires provoquent une augmentation modérée des transaminases. Le retour à la normale est rapide.

33. Lactate déshydrogénase

3.3.1. Rôle

La lactate déshydrogénase (LDH) est présente dans de nombreux organes, cœur, foie, muscle, rein.

Elle catalyse la réaction suivante :

$$\text{Acide pyruvique} + NADH,H^{+} \xleftrightarrow{LDH} \text{acide lactique} + NAD^{+}.$$

3.3.1.1. Valeurs usuelles

200 à 600 U/l (cinétique UV à 37 **°C** par la méthode des plaques LDH Vitros, lecture à 340 nm).

De très nombreuses méthodes donnent des valeurs physiologiques des LDH inférieures à 250 U/l, tout en utilisant aussi des cinétiques à 37 °C avec lecture à 340 nm. Nous retrouvons ici toute l'importance de la standardisation de la mesure des activités enzymatiques.

3.3.2. Variations pathologiques

3.3.2.1. Affections cardiaques

Lors d'un infarctus du myocarde, l'augmentation du taux de LDH débute à la 10e heure, atteint ***son maximum de la*** *48e* ***heure à la*** *72e* ***heure,*** le retour à la normale s'effectuant en 15 jours.

3.3.2.2. Affections hépatiques

Les valeurs des LDH augmentent beaucoup au cours des hépatites.

Le taux est également très élevé dans les ictères préhépatiques. L'augmentation est importante dans les ictères hémolytiques.

Dans les métastases hépatiques des cancers on constate une forte augmentation du taux des LDH.

Les LDH augmentent également dans les intoxications aiguës graves avec hépatonéphrite, dans les tumeurs en général.

3.3.2.3. Anémies

L'anémie pernicieuse présente des valeurs extrêmement élevées de LDH pouvant atteindre 8 000 à 10 000 U/l.

Les anémies hémolytiques présentent des taux de LDH moins élevés de 1 000 à 2 000 U/l.

Lors des derniers mois de la grossesse et au moment de l'accouchement, on peut remarquer une augmentation du taux des LDH qui revient rapidement à la normale.

3.3.3. Détermination de l'activité enzymatique de la lactate déshydrogénase

Nous avons déjà vu plusieurs fois cette réaction qui est souvent couplée à d'autres pour déterminer les activités d'autres enzymes.

Ici la réaction est directe :

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH,H}^{+} \xleftrightarrow{\text{LDH}} \text{L-lactate} + \text{NAD}^{+}$$

La vitesse initiale d'oxydation du NADH est proportionnelle à l'activité catalytique de la LDH. Elle est déterminée par mesure de la diminution d'absorbance à 340 nm.

3.4. Isoenzymes des LDH

La lactate déshydrogénase sérique possède cinq variétés d'isoenzymes différentes qui peuvent être séparées par électrophorèse du sérum sur acétate de cellulose.

Ces isoenzymes résultent de l'association quatre par quatre de deux types **de** protomères (A et B).

LDH_1 = 84
$LDH_2 = A_1B_3$
LDH3 = A_2B_2
$LDH_4 = A_3B_1$
LDH_5 = A4.

Chaque isoenzyme a un poids moléculaire voisin de 140 000 Da et chaque monomère un poids moléculaire de 35 000 Da.

3.4.1. Étude électrophorétique globale

À l'électrophorèse les 5 isoenzymes sont séparées suivant leur vitesse de migration en LDH_1, LDH_2, LDH_3, LDH_4 et LDH:5. La LDH_1 est la plus rapide.

La répartition de ces isoenzymes varie selon les tissus. La LDH_1 prédomine dans le cœur alors que la LDHc prédomine dans le foie et dans les muscles squelettiques.

L'évaluation quantitative de chaque variété d'isoenzymes est intéressante en clinique, car l'atteinte d'un organe entraînera le passage dans le sérum du type d'isoenzyme qu'il contient.

Les pourcentages de chacun des isoenzymes de LDH observés dans le sérum humain sont les suivants :

LDH_1 = 20 %
LDH;, = 40 %
LDH3 = 20 %
LDH4 = 10 %
LDH_5 = 10 %.

Lors d'un *infarctus du myocarde* on trouve surtout dans le sérum de la LDH_1 d'origine cardiaque, qui représente alors environ 50 % (figure 10.3).

Lors d'une *hépatite infectieuse* on constate une augmentation de la LDH_5, pouvant atteindre 50 %.

Dans les *myopathies* la LDH_5 n'est pas présente car la biosynthèse ne se fait pas, à cause d'un déficit génétique.

3.4.2. a-hydroxybutyrate déshydrogénase a HBDH

L'a-hydroxybutyrate déshydrogénase est l'isoenzyme rapide de la LDH, LDH), ou B4, spécifique du myocarde.

Elle catalyse la déshydrogénation de l'a-hydroxybutyrate, utilisant directement les coenzymes nicotiniques.

a hydroxybutyrate + NAD^+ <——————> a cétobutyrate + NADH, H^+.

L'a-HBDH présente dans l'infarctus du myocarde une augmentation qui débute à la 12e heure et son maximum est compris entre la 30e et la 72e heure.

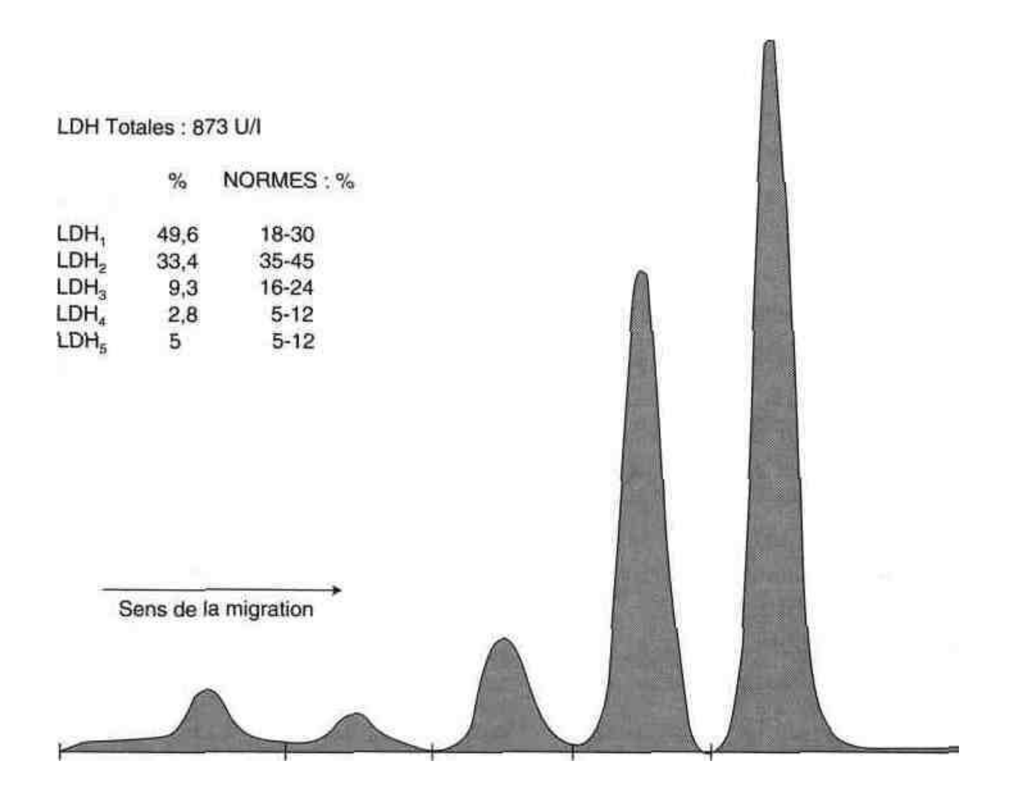


Figure 10.3 • Courbe électrophoretique des isoenzymes des LDH, avec les pourcentages de chaque isoenzyme, d'un sérum de malade présentant un infarctus du myocarde.

3.5. Créatine kinase

15.2. *Rôle*

La créatine kinase ou CK est une enzyme d'origine musculaire, myocardique et cérébrale qui catalyse le transfert d'un phosphate de l'ATP sur la créatine, permettant ainsi le stockage d'énergie en vue de la contraction musculaire.

Créatine+ATP <—CK—> Créatine Phosphate + ADP.

Rappelons que ce phosphagène ou créatine phosphate participe activement à la contraction musculaire en tant que fournisseur de deuxième rang pour l'ATP nécessaire. Le premier rang est l'ATP présent sur les fibres de myosine en contact avec l'actine et le troisième rang est l'ATP fabriqué par la glycogénolyse et la glycolyse.

3.5.2. *Valeurs usuelles*

***40 à 290 Vil* (Cinétique** UV à 37 °C).

3.5.3. Variations pathologiques

Dans *l'infarctus du myocarde* **l'élévation du taux de CK est très précoce** *(dès **la** 3e **heure) pour atteindre son maximum entre la** 24e **et la 36e*** heure et revenir à la normale en 3 ou 4 jours.

Dans *les myopathies,* l'augmentation est importante dès le début de la maladie. Le dosage de la CK est intéressant pour dépister les jeunes filles hétérozygotes (porteuses du gène), qui sont susceptibles de transmettre la tare héréditaire. Leur taux de CK est en effet toujours supérieur à celui d'une population féminine du même âge.

On peut observer une légère augmentation de la CK en fin de grossesse et au moment de l'accouchement. Les taux redeviennent rapidement normaux.

3.5.4. Détermination de l'activité enzymatique de la créatine kinase

L'ensemble des réactions suivantes permet de déterminer l'activité de la créatine kinase :

Créatine phosphate + ADP <—CK—> créatine + ATP.

ATP + D glucose <—hexokinase—> ADP + glucose 6 phosphate.

Glucose 6 phosphate + NADP+ <—G6PDH—> gluconate 6 phosphate + NADPH, H"*".

GgPDH = Glucose 6 phosphate déshydrogénase.

La vitesse de formation du NADPH est proportionnelle à l'activité catalytique de la CK. Elle est déterminée par mesure de l'augmentation d'absorbance à 340 nm.

3.6. Isoenzymes de la CK

La CK est une enzyme dimérique composée de deux sous-unités polypeptidiques : M *(muscle)* et B *(brain* = cerveau) qui forment en s'associant trois isoenzymes : CKgg ou CKp CK_{MB} ou CK_2 et CK_{MM} ou CK_3.

Ces isoenzymes sont trouvées chez le sujet normal dans des proportions différentes selon les tissus : le cerveau renferme pratiquement 100 % de CKgg, les muscles squelettiques environ 96 % de CK_{MM} et 4 % de CK_{MB}, le myocarde 60 % de CK_{MM} et 40 % de CK_{MB}.

De petites quantités de ces isoenzymes sont également observées dans d'autres tissus, comme le tractus gastro-intestinal ou dans divers organes parenchymateux : utérus, prostate, rein, foie.

3.6.1. *CK_{MB}*

Le principal intérêt de cette étude réside dans le dosage de la CK_{MB} ou CK_2, très utile pour aider au diagnostic d'un infarctus du myocarde, pour distinguer un infarctus d'une embolie pulmonaire (dans le cas de l'embolie pulmonaire, la CK totale est élevée mais l'isoenzyme MB est normale), pour surveiller l'évolution d'une nécrose myocardique ou enfin l'état du myocarde après chirurgie à cœur ouvert.

3.6.1.1. Valeurs usuelles

6 à 16 *U/l* (cinétique UV 37 °C).

*3.6.1.2. Détermination de la **CK_{MB}***

La CK>.g se compose des sous-unités CK_M et CKg. L'utilisation d'anticorps spécifiques permet l'inhibition immunologique des sous-unités CK_M. L'activité restante ou activité CKg qui correspond à la moitié de l'activité CK_{MB} est alors déterminée selon la méthode optimisée traditionnelle.

Cette mesure n'est valable que dans le cas où il n'y a pas de traumatisme crânien ou de tumeur cérébrale, car normalement le sérum humain ne possède pas de CKgg et toute augmentation de la CKg provient bien de la CK_{MB}.

3.6.1.3. *Détermination de la **CK_{MB}** massique*

La CK»,g massique fait partie des nouveaux marqueurs de la souffrance cardiaque, elle possède une activité enzymatique mais elle est déterminée de façon

pondérale et non cinétique grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Les résultats sont alors exprimés en ug/1. Ces tests ont augmenté les performances de la CK_{MB} et sont préférables à la détermination de la CK_{MB} activité.

Valeurs usuelles : **inférieures à 7 *fig/l.***

3.7. Isoformes de la CK

Les isoenzymes MM et MB de la CK sont elles mêmes hétérogènes et présentent des isoformes résultant de la dégradation dans le plasma de la forme tissulaire des isoenzymes après leur passage dans la circulation. Les CK_{MM} possèdent trois isoformes et les CK_{MB} n'en possèdent que deux. Il existe des possibilités de séparation par électrofocalisation, les résultats sont alors donnés en pourcentage, mais il existe également des méthodes immunologiques pour les déterminer.

3.8. Macro-CK

Les CK, comme de nombreuses enzymes peuvent exister sous une forme particulière appelée « **macroenzyme** » qui correspond à une forme circulante d'enzyme associée le plus souvent à des immunoglobulines, parfois à des lipoprotéines.

On distingue deux types de macro-CK :

- *macro-CK de type 1* qui correspond à une **CK_1-IgG** ou, rarement, à une **CK_3-IgA**. Cette macroenzyme existerait principalement chez 2 à 5 % des femmes âgées et serait associée à des maladies intestinales de type colite ulcérative ou à des infections des voies respiratoires supérieures ;
- *macro-CK de type 2 ou CK mitochondriale* qui est une CK auto-agrégée. Elle serait surtout présente chez le nouveau-né atteint d'affection néoplasique avec métastases hépatiques.

En fait, la signification physiopathologique de ces macroenzymes reste mal comprise (dérèglement immunitaire, reflet d'un processus tumoral ?) mais leur présence interfère avec les techniques classiques d'étude des isoenzymes. Il est donc important que le biologiste puisse les détecter.

Le signe d'appel biologique est une valeur anormalement élevée de CK_{MB} (parfois supérieure à la CK totale), surtout avec les techniques d'immuno-inhibition.

3.9. Amylase

3.9.1. *Rôle*

L'a-amylase existe dans les glandes salivaires et le pancréas. Elle dégrade l'amidon du contenu intestinal pour le transformer en dextrines et en maltose.

3.9.2. Valeurs usuelles

30 à 110 *Vil* (cinétique UV à 37 °C).

3.9.3. Variations pathologiques

On note une augmentation de l'amylasémie dans les affections suivantes :

3.9.3.1. Pancréatite aiguë hémorragique

L'amylasémie augmente *au cours de la pancréatite aiguë hémorragique,* pouvant atteindre 30 à 40 fois la valeur normale. Cette augmentation se manifeste entre la 3e et 6° heure après le début de l'affection, atteint son maximum entre la 20° et la 30e heure et se normalise entre 2 à 8 jours.

L'amylasémie doit toujours être complétée par *l'amylasurie* car l'amylase est éliminée par les urines. Le décalage des signes urinaires est de 6 à 12 heures.

3.9.3.2. *Pancréatites chroniques et cancers du pancréas*

L'augmentation de l'amylase n'est pas aussi importante que dans les pancréatites aiguës.

3.9.3.3. Parotidites

L'amylasémie est augmentée dans les parotidites virales telles que *les oreillons,* et le dépistage précoce des enfants contagieux a été proposé pour permettre une éviction scolaire rapide.

Une élévation marquée au cours de l'évolution de la maladie doit d'ailleurs faire penser à une réaction pancréatique secondaire.

3.9.3.4. *Autres affections entraînant une augmentation de l'amylasémie*

- perforation d'ulcères gastro-intestinaux ;
- occlusions intestinales hautes ;
- lithiase biliaire ;
- rupture de grossesse extra utérine.

Une augmentation de l'amylasémie peut aussi traduire un défaut d'élimination rénale par diminution de la filtration glomérulaire.

L'amylase peut se combiner avec des glycoprotéines sanguines (immunoglo-

bulines IgG ou IgA) pour former des « *macro-amylases* » qui dans ce cas ne seront plus filtrées par le glomérule. On observe alors une hyperamylasémie sans hyperamylasurie.

3.9.4. Détermination de l'activité enzymatique de l'amylase

L'activité de l'amylase peut-être mesurée par une méthode UV en cinétique utilisant le maltotétraose comme substrat.

Maltotétraose + H_2O $\xrightarrow{\alpha \text{ amylase}}$ 2 maltoses.

Maltose + phosphate $\xrightarrow{\text{hydrolase}}$ glucose + β D glucose-1 phosphate.

β D glucose 1 phosphate $\xrightarrow{\text{phosphoglucomutase}}$ glucose 6 phosphate.

Glucose 6 phosphate + NAD^+ $\xrightarrow{G_6PDH}$ 6 phospho-gluconate + NADH + H^+.

G_6PDH = glucose phosphate déshydrogénase.

La vitesse de formation du NADH est proportionnelle à l'activité catalytique de l'a amylase. Elle est déterminée par mesure de l'augmentation d'absorbance à 340 nm.

On peut séparer **deux** isoenzymes de l'amylase **: les** isoenzymes d'origine pancréatique et les isoenzymes d'origine salivaire.

3.10. **Lipase**

3.10.1. Rôle

La lipase pancréatique, la plus importante, fonctionne en présence d'un cofacteur d'origine protidique, la colipase. Elle dégrade les triglycérides du contenu intestinal en diglycérides puis en monoglycérides. Seule une partie des monoglycérides sera transformée en glycérol et acides gras.

170.2. *Valeurs usuelles*

***20 à 210 U/l* à** 37 **°C** (cinétique à 400 nm).

3.10.3. Variations pathologiques

On rencontre une hyperlipasémie :

- dans les pancréatites aiguës ;
- dans les pancréatites chroniques ;
- dans les cancers de la tête du pancréas ;
- dans les atteintes hépatiques.

On note une hypolipasémie :
- dans les premiers mois de la grossesse ;
- dans les maladies infectieuses (tuberculose) ;
- dans l'évolution du diabète.

3.10.4. Détermination de l'activité enzymatique de la lipase

La détermination de l'activité lipasique se fait par turbidimétrie.

Triglycérides + H_2O $\xrightarrow{\text{lipase}}$ glycérol + acides gras (mono et diglycérides solubles).

La lecture se fait à 400 nm.

3.11. 'Y-glutamyltransférase

3.11.1. Rôle

La •y-glutamyltransférase ou gamma glutamyl transpeptidase ou γGT ou GGT exerce son activité catalytique dans des réactions de transfert et d'hydrolyse :

γ Glutamylpeptide + acide aminé $\xrightarrow{\text{'yGT}}$ y glutamyl acide aminé + peptide.

La **γ-glutamyltranspeptidase** sert au transport membranaire du radical glutamyl mais aussi d'autres aminoacides.

3.11.2. Valeurs usuelles

***5 à 80 VU* à** 37 **C°** (cinétique à 405 **nm).**

3.11.3. Variations pathologiques

On note une augmentation des 'yGT dans les affections suivantes :

3.11.3.1. *Éthylisme chronique*

Les γGT augmentent chez *tout individu qui absorbe de l'alcool en quantité.* La prise d'alcool peut entraîner une hépatite toxique anictérique avec augmentation de la 7GT.

Dans *les* ***cirrhoses d'origine*** *éthylique,* l'augmentation des γGT est très importante.

Le retour à la normale est assez rapide dès l'arrêt de la prise d'alcool chez un sujet non stéatosique, alors que chez le cirrhotique les valeurs baissent mais ne reviennent pas tout à fait à la normale.

3.11.3.2. Cancers du foie

Dans les cancers primitifs du foie et dans les cancers avec *métastases hépatiques,* on constate une augmentation importante et rapide de la **γGT**. L'augmentation de la **γGT** est souvent le premier signe de la présence de métastase hépatique.

3.11.3.3. Cholestase

On constate une augmentation rapide de la **γGT** dans tout ictère par obstruction, comme d'ailleurs *dans toute cholestase.*

3.11.3.4. Intoxications médicamenteuses

De nombreux médicaments augmentent les taux de la **γGT** tels que les anticoagulants, les antiépileptiques, les neuroleptiques et certains contraceptifs oraux.

3.11.3.5. Affections pancréatiques et hépatiques

On constate une augmentation de la γGT dans les *pancréatites aiguës et dans le cancer de la tête du pancréas.*

Dans *les hépatites virales,* la γGT ne présente pas **d'intérêt** diagnostique. Elle peut néanmoins être utilisée pour confirmer la guérison.

3.11.4. Détermination de l'activité enzymatique de la y-glutamyltransférase

La détermination de la **γGT** est faite par une méthode cinétique colorimétrique utilisant le L **γ-glutamyl**-4 nitranilide.

Glutamyl-4-nitranilide + glycylgiycine $\xrightarrow{\gamma GT}$ glu-glycylgiycine + 4 nitraniline.

La vitesse de formation de la 4 nitraniline, qui correspond à l'activité de la γGT, est déterminée en mesurant l'augmentation d'absorbance à 405 nm.

3.12. **Aldolase**

3.72.7. Rôle

L'aldolase est d'origine musculaire ou hépatique.

Elle scinde le fructuose 1-6 diphosphate en 3 phosphoglycéraldéhyde et phosphodihydroxyacétone au niveau de toutes les cellules dans la glycolyse, et le fructose 1 phosphate en phospho-dihydroxyacétone et glycéraldéhyde au niveau du foie.

3.12.2. Valeurs usuelles

0,5 à 7,6 U/l à 37 °C (cinétique UV à 340 nm).

3.12.3. Variations pathologiques

3.12.3.1. Au niveau musculaire

On note une augmentation considérable de l'aldolase dans les myopathies.
L'aldolase est avec la CK une enzyme de la pathologie musculaire.
On peut déceler chez des femmes porteuses de tare myopathique hétérozygote une augmentation du taux de l'aldolase.

3.12.3.2. Au niveau hépatique

On observe une augmentation très importante au cours des hépatites virales, mais en général cette enzyme n'est utilisée ni pour dépister ni pour suivre l'évolution d'une hépatite virale.

3.12.4. Détermination de l'activité enzymatique de l'aldolase

Fructose 1-6 diphosphate $\xleftrightarrow{\text{Aldolase}}$ 3-phospho-glycéraldéhyde + phospho-dihydroxy acétone.

Si on bloque la voie glycolytique du 3-phospho-glycéraldéhyde, on peut mesurer l'activité de l'aldolase en utilisant la transformation de la dihydroxy acétone :

3-Phospho-glycéraldehyde $\xleftrightarrow{\text{Triose phosphate isomérase}}$ phospho-dihydoxy acétone.

Phospho-dihydroxy acétone + NADH,H^+ $\xleftrightarrow{\text{Glycérophosphate déshydrogénase}}$ 3 phospho-glycérol + NAD^+
et là encore, on mesure la décroissance d'absorption à 340 nm.

4. *Synthèse clinique*

4.1. Intérêt des enzymes et des autres marqueurs en cardiologie

Dans l'infarctus du myocarde il est nécessaire pour être efficace d'instaurer un traitement le plus rapidement possible. Le passage de la CK au niveau sérique ne se produit pas immédiatement mais au bout de trois ou quatre heures. Afin d'être le plus efficace possible, il est souhaitable d'ajouter au bilan enzymatique le dosage de la ***myoglobine*** (Mb). La myoglobine n'est pas une enzyme

mais, à cause de son faible poids moléculaire, elle passe plus rapidement dans le sérum. Son origine est musculaire, cardiaque et squelettique. Elle est éliminée rapidement par les urines sous forme de myoglobinurie.

Son dosage peut être effectué actuellement en urgence d'une façon fiable et précise par immunoturbidimétrie. La méthode de référence est une méthode radio-immunologique mais moins rapide, elle ne peut pas être effectuée en urgence.

En chirurgie cardiovasculaire, il n'est pas possible d'utiliser le dosage de la myoglobine car sa valeur augmente par le simple fait de l'intervention.

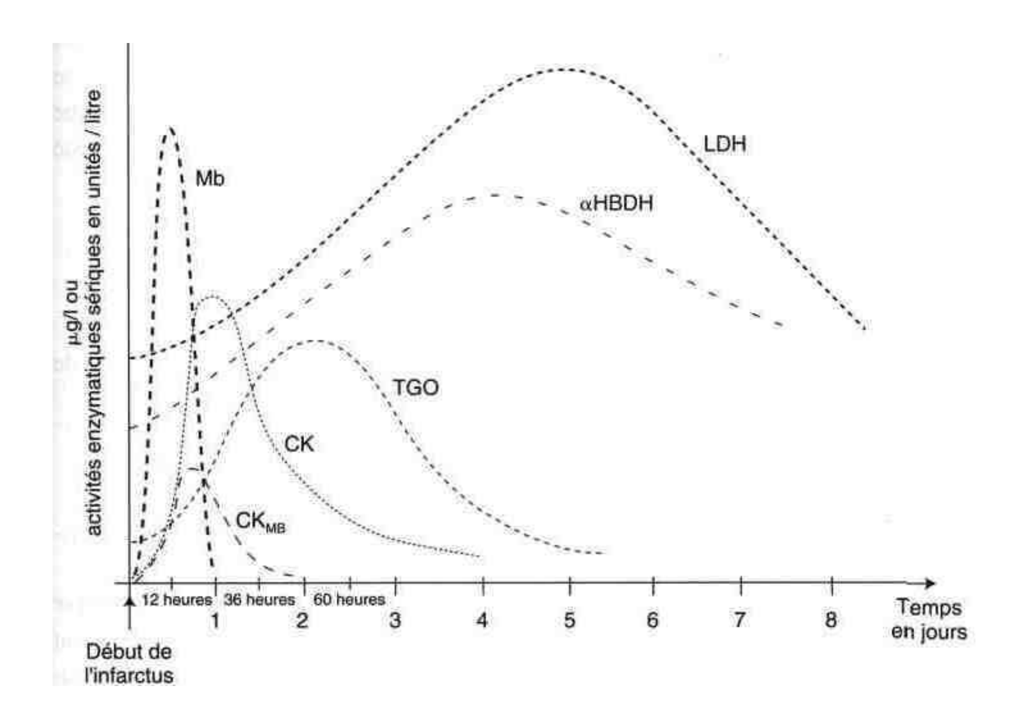
4.1.1. Enzymes du bilan cardiaque

Les enzymes du bilan cardiaque sont les suivantes, données par ordre chronologique :

CK et CK_{MB}, TGO et TGP, LDH et a HBDH.

Seules la CK_{MB} et l'a HBDH sont spécifiques du tissu cardiaque, les autres se retrouvent aussi bien dans le foie que dans le cœur.

L'augmentation de l'activité de ces enzymes et leur évolution en fonction du temps sont représentées dans la figure 10.4 :



• *Figure 10.4* • Représentation graphique de l'évolution des marqueurs biochimiques au cours de l'infarctus.

La diffusion plus ou moins rapide de ces enzymes est en partie fonction de leur poids moléculaire. Ces activités enzymatiques apparaissent, passent par un maximum et disparaissent à peu près dans le même ordre :

1° CK_{MB} et CK totales.
2° **TGO.**
3° CtHBDHetLDH.

4.1.2. Autres marqueurs

Actuellement de nouveaux marqueurs protéiques tels que la **myoglobine** et **les troponines cardiaques** Tnic et TnTc jouent un rôle primordial. La myoglobine passe rapidement dans le sang et permet une réponse dans les trois heures qui suivent l'atteinte cardiaque, alors que la troponine plus tardive (6e heure) est plus sélective.

Le couple myoglobine et troponine est pour le clinicien une aide considérable (cf chapitre 9 Protéines plasmatiques. Marqueurs non enzymatiques de la souffrance cardiaque, paragraphe 1.3.3).

4.2. Intérêt des enzymes en hépatologie

Le foie est l'organe qui renferme le plus grand nombre d'enzymes. Certaines enzymes sont spécifiques du foie, c'est le cas de l'OCT ; d'autres enzymes se retrouvent également dans d'autres organes mais la concentration hépatique reste chez l'homme la plus importante. Les enzymes de l'exploration biologique du foie sont les suivantes :

1° TGO-TGP.
2° Phosphatases alcalines et 5'nucléotidase.
3° **γGT.**
4° **LDH.**

Ces enzymes augmentent différemment suivant qu'il s'agit d'un syndrome de cytolyse ou de cholestase.

4.2.1. Cytolyse

Le syndrome de cytolyse est commun à toute hépatite quelle qu'en soit l'origine.

Les transaminases sont les seules enzymes utilisées en pratique pour **dépister une hépatite.** La figure 10.5 montre bien que l'augmentation des TGP avant même le début de l'ictère, a un rôle prépondérant dans le diagnostic de l'hépatite aiguë.

Bien que l'importance de l'augmentation soit proportionnelle à la gravité des lésions, elle **n'a** *pas de valeur pronostique.* Son taux doit revenir à la normale en 4 à 5 semaines.

Il y a également une augmentation des LDH, de l'aldolase hépatique et de l'OCT, mais ces déterminations n'apportent rien au diagnostic.

Les phosphatases alcalines et les γGT ne sont que très modérément augmentées.

Vhyperbilirubinémie conjuguée se manifeste quelques jours après l'augmentation des transaminases.

L'hépatite virale aiguë représente le cas le plus facile à diagnostiquer. Son origine sera déterminée par la recherche des marqueurs immunologiques. Ceci permettra de détecter soit le virus A, soit le B, plus rarement le C.

Certaines hépatites peuvent se prolonger et passer à la **chronicité,** pouvant se transformer en cirrhose. La plupart des cirrhoses non éthyliques ont effectivement pour origine une hépatite virale.

Il existe aussi des **hépatites anictériques** qui ne peuvent être mises en évidence que par la détermination des transaminases (éviction des donneurs de sang par exemple).

Dans **l'hépatite éthylique,** on constate une augmentation rapide et importante des 7GT. On note souvent une *augmentation des TGO* supérieure à celle des TGP, comme le montre la figure 10.6.

L'introduction du dosage systématique des transaminases dans les examens de santé amène parfois à rencontrer des valeurs élevées, isolées, qui ont le plus souvent une origine médicamenteuse.

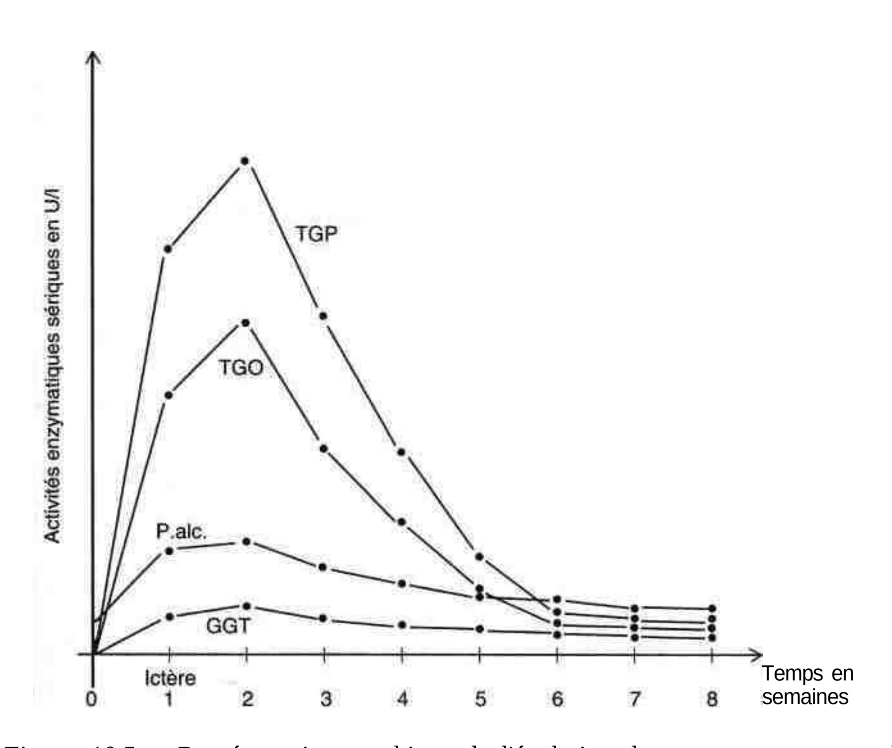


Figure 10.5 • Représentation graphique de l'évolution des enzymes au cours d'une hépatite virale icténque.

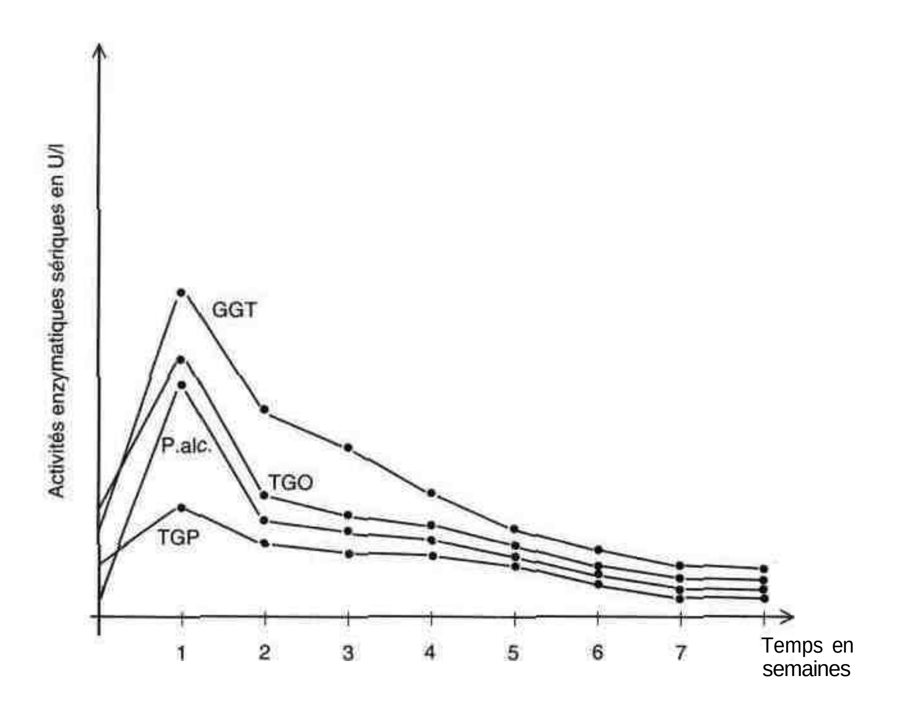


Figure 10.6 • Représentation graphique de l'évolution de l'activité des enzymes lors d'une hépatite éthylique aiguë.

4.2.2. Rétention biliaire

Au cours de l'ictère obstructif, deux enzymes présentent un grand intérêt, comme le montre la figure 10.7, ce sont les **γGT** et les phosphatases alcalines.

Les transaminases sont également augmentées mais de façon bien moins importante que dans les hépatites, avec un retour à la normale très rapide.

On notera également une augmentation isolée des phosphatases alcalines à la suite de prises prolongées de certains médicaments tels que les antiépileptiques et les anticoagulants.

Lorsque l'on observe une augmentation des phosphatases alcalines sans signe clinique, il est conseillé de déterminer les isoenzymes des phosphatases alcalines.

L'augmentation isolée de la **γGT** doit faire penser à un *alcoolisme chronique*. Mais cette augmentation peut aussi se produire lors de la prise prolongée de certains médicaments tels que les antidépresseurs ou les anticonvulsivants. Parfois aucune étiologie ne pourra être décelée (cf. chapitre 12 Exploration fonctionnelle hépatique).

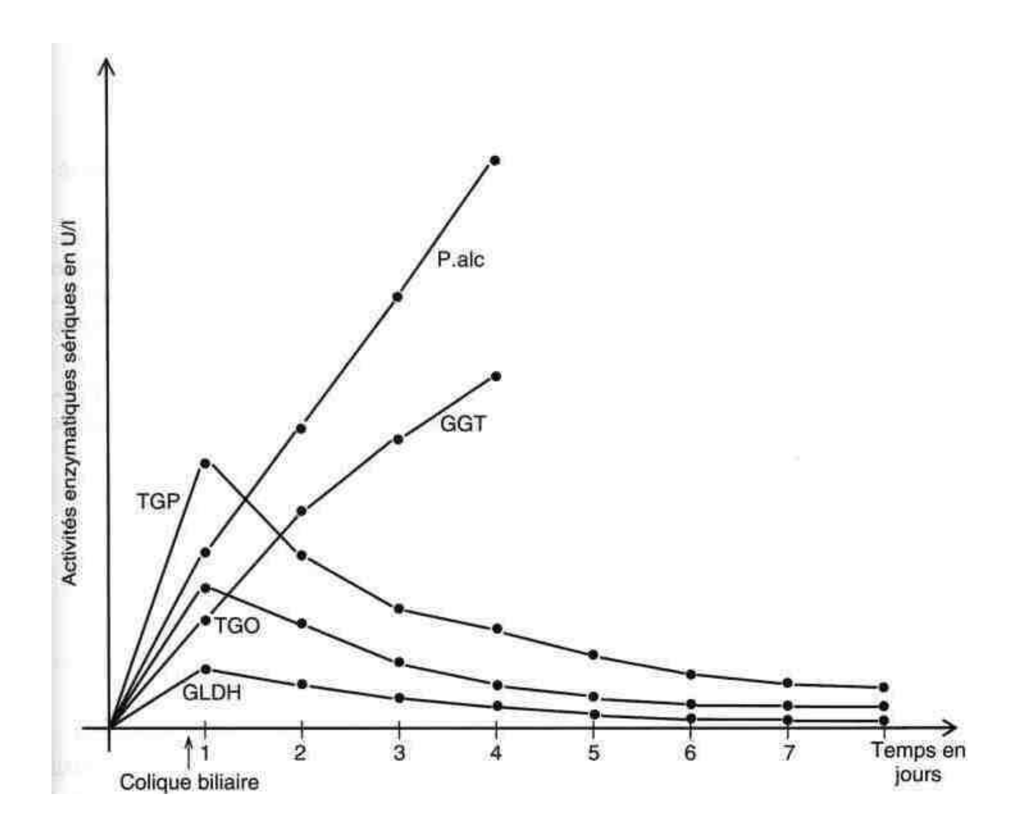


Figure 10.7 • Représentation graphique de l'évolution de l'activité des enzymes **au** cours d'un ictère obstructif d'origine calculeuse.

4.3. Enzymes musculaires

Les enzymes intéressantes sont la créatine kinase et l'aldolase.

L'augmentation de l'isoenzyme musculaire MM de la CK existe dans diverses myopathies mais aussi lors d'une rhabdomyolyse d'origine traumatique ou toxique.

L'aldolase possède deux isoenzymes, l'une hépatique l'autre musculaire. L'isoenzyme hépatique n'est pas intéressante car d'autres enzymes existent pour apprécier l'atteinte hépatique. L'isoenzyme musculaire est, par contre, beaucoup plus utile à mesurer, en utilisant un substrat spécifique, le fructose 1-6 diphosphate, métabolite de la glycolyse musculaire.

Des constituants non enzymatiques sont aussi intéressants à déterminer au cours de la pathologie musculaire ; ce sont la **myoglobine** et la **myosine** dont l'augmentation va de pair avec la destruction musculaire, et la **créatine** qui augmente aussi bien dans le sang que dans l'urine lors des myopathies.

Références bibliographiques

S. Bernard, *Biochimie clinique,* Maloine, Paris 1984.

J.-P. Borel, *Biochimie dynamique*, Maloine, Paris,1987.

M. Charrel, *Séméiologie biochimique,* Ellipses, Éditions Marketing, Paris, 1991.

M.G. Jones, *Thé clinical biochemistry ofcreatine kinase,* JIFCC, 1990, 2, Issue 3, 108.

P. Louisot, *Biochimie générale et médicale,* Biochimie structurale, métabolique, séméiologique, SIMEP, Villeurbanne, 1982.

F. Mauriat, *Les phosphatases alcalines et isoenzymes.* Rubriques de l'interne, 1990, Option Bio n° 25.

E. et F.W. Schmidt, *Manuel d'enzymologie clinique, Boehringer Mannheim,* 1973.

G. Lefevre, H. Graine. *Les nouveaux marqueurs de la nécrose cardiaque : aspects analytiques et diagnostiques.* Option Bio, 24 juillet 1998. supplément au numéro 211.212.

G. Lefevre. *Les troponines : aspects biologiques et cliniques.* Annales de Biologie Clinique, 2000 ; 5 : 39-48.

11

Constituants azotés non protéiques

France de La Farge
Pierre Valdiguié

On désigne sous ce nom une foule de substances diverses issues du métabolisme protéique dont l'intérêt est d'être fréquemment dosées ou explorées car touchant à de multiples aspects de la pathologie médicale.

Nous limiterons notre étude aux composés suivants directement impliqués, pour la plupart dans les diagnostics ou la surveillance quotidienne :

- urée ;
- créatinine ;
- ammoniac ;
- bilirubine ;
- acide urique.

Pour chacun de ces composés, nous décrirons successivement les notions biochimiques ou physiologiques fondamentales, les moyens d'exploration, les applications cliniques et les principales techniques de dosage.

1. Urée

L'urée est le terme ultime principal du catabolisme protéique chez l'homme. Atoxique, très soluble, elle s'élimine à 90 % dans les urines, un peu dans la sueur et la salive, très peu dans les matières fécales.

Le dosage de l'urée dans le sang ou **azotémie** et dans l'urine est le paramètre le plus ancien de la biochimie clinique ; associé aux dosages du glucose et des éléments de l'iogramme, il reste aujourd'hui l'un des plus demandés. En néphrologie pure, le dosage de l'urée plasmatique et urinaire est dépassé par celui de la créatinine, mais il reste un précieux élément d'appoint.

1.1. Rappels physiologiques

L'urée se forme dans le foie (figure 11.1) essentiellement aux dépens du groupement NH_3 des aminoacides. L'urée diffuse librement à travers les membranes cellulaires. Son élimination se fait par le rein par filtration glomérulaire et sa réabsorption tubulaire partielle est **passive : elle dépend donc du flux du liquide urinaire dans le néphron.**

Une partie très importante de l'ammoniac issu de la désamination des acides aminés est combinée avec des radicaux carbonés pour former l'urée. Les réactions conduisant à la formation de l'urée constituent la voie métabolique dite de l'uréogénèse, exclusivement hépatique.

L'urée n'est pas dégradée dans les tissus de l'organisme, elle est l'élément terminal du catabolisme protéique, permettant l'élimination d'un CO_2 et de deux NH_3 dans sa formule simple : $OC(NH_2)_2$.

Son élimination urinaire, variable en fonction de la diurèse, rend la clairance difficile à interpréter, alors que la confrontation simple du taux de l'urée urinaire au taux de l'urée plasmatique conserve tout son intérêt.

Le dosage de l'urée sanguine permet, avec celui de la créatinine, de détecter l'insuffisance rénale.

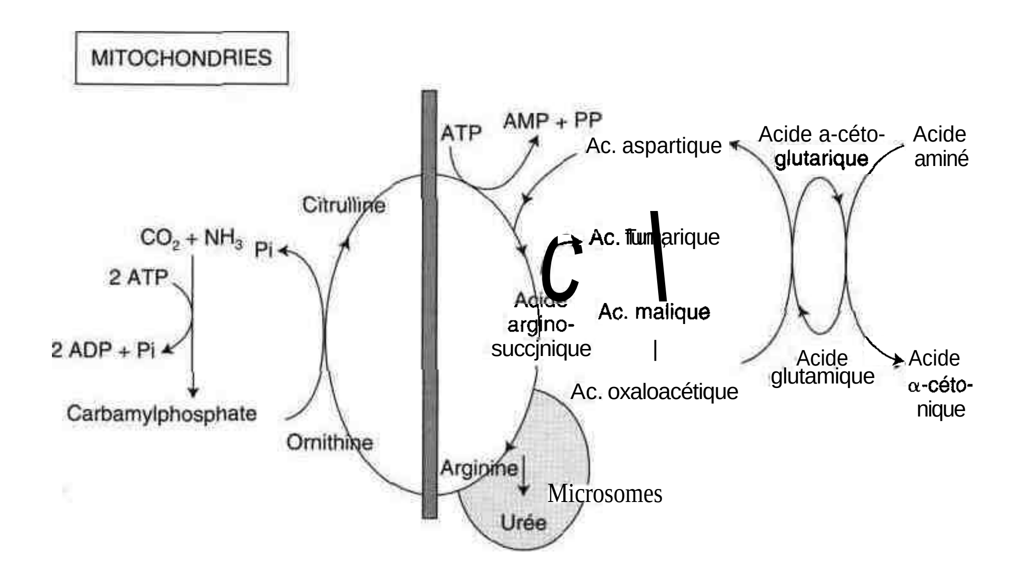


Figure 11.1 • Cycle de l'urée.

1.2. Méthodes d'exploration

1.2.1. Détermination de l'urée sanguine et urinaire

La détermination du taux de l'urée sanguine est un moyen grossier d'évaluation de la fonction rénale. Ce taux d'urée sanguine, reflet de la valeur de la fonction rénale, est aussi influencé par les apports azotés alimentaires et le volume urinaire des 24 heures.

L'urée urinaire est donc très variable, dépendant du régime alimentaire et de la diurèse. Elle peut fluctuer entre 200 et 500 mmol par 24 heures.

1.2.2. Interprétation du taux de l'urée sanguine et urinaire

II est nécessaire de comparer les trois valeurs suivantes :
- urée sanguine ;
- urée urinaire ;
- débit uréique journalier.

Le débit uréique journalier renseigne sur la ration alimentaire. Il permet d'interpréter le taux d'urée sanguine. Un taux d'urée sanguine à la limite supérieure de la normale avec une excrétion uréique élevée, reflet d'apports azotés importants, peut être compatible avec une fonction rénale normale. Ce même taux d'urée (8 à 9 mmol/1) avec excrétion uréique faible qui correspond aussi à un apport azoté faible, doit faire penser à une insuffisance rénale.

La comparaison de la concentration uréique urinaire, du volume de la diurèse des 24 heures et du taux de l'urée plasmatique permet une appréciation du **pouvoir de concentration du rein.**

L'urée sanguine se **situe aux alentours de** 5 *mmol/l* chez l'adulte sain disposant d'une ration protéique normale en climat tempéré. Les variations physiologiques de la diurèse, les écarts de la ration protéique alimentaire combinent leurs actions pour élargir la fourchette de normalité *(2,5 à 7,5 mmol/l).*

1.2.3. Clairance de l'urée

La clairance de l'urée reflète le pouvoir d'épuration du plasma par le rein vis-à-vis de l'urée. Elle est donnée par la formule générale :

$$C\ \text{urée} = \frac{u}{P} \times V.$$

U = concentration urinaire de l'urée en mmol/l.
P = concentration plastique de l'urée en mmol/l.
V = débit urinaire en ml/mn ou en ml/s.

La valeur de la clairance de l'urée croît avec le volume de la diurèse car l'urée est filtrée par le glomérule et réabsorbée en partie par le tubule. *Cette réabsorption est passive, elle s'accroît au faible débit urinaire et diminue au fort débit.*

L'influence du régime alimentaire et du volume de la diurèse sur le taux plasmatique de l'urée a fait abandonner la clairance de l'urée au profit de la clairance de la créatinine.

1.3. Variations pathologiques

Une chute du taux d'urée sanguine au dessous de 2 mmol/1 chez l'adulte avec une chute du taux de l'urée urinaire s'observe au stade terminal des **grandes insuffisances hépatiques,** témoignant d'une déchéance profonde et irréversible de la fonction uréogénique du foie, en même temps que s'installent l'hyperammoniémie et le coma hépatique.

Beaucoup plus fréquent est le *syndrome de rétention awtée* qui associe une hyperazotémie à des taux d'urée variables, dans le cadre des **insuffisances rénales aiguës et chroniques.**

L'urée sanguine reste un paramètre de dépistage grossier des maladies rénales. En pathologie néphrologique, elle est toujours associée au dosage de la créatinine, voire à la clairance de la créatinine. Les deux paramètres urée et créatinine se complètent sans s'exclure.

L'élévation de l'urée sanguine (ou hyperazotémie) a donné son nom au syndrome clinique observé dans l'insuffisance rénale chronique : l'urémie.

1.3.1. Azotémies rénales

1.3.1.1. Néphrites chroniques

Lors des néphrites chroniques l'urée sanguine augmente progressivement. Son taux permet d'apprécier l'évolution de la maladie. Le taux sanguin peut alors atteindre 30, 50 et même 60 mmol/1.

L'augmentation de l'urée est liée à un trouble de l'excrétion rénale.

Les atteintes rénales globales et chroniques entraînent non seulement un défaut d'élimination de l'urée, mais aussi des sulfates, des phosphates, des ions **H"1". Lorsque** l'azotémie est sévère la détermination de l'ionogramme, de la réserve alcaline, du pH sont indispensables. La présence d'une acidose métabolique liée à la rétention des acides organiques, des sulfates et des phosphates est souvent observée et n'améliore pas le pronostic.

1.3.1.2. Néphropathies aiguës

- *Glomérulonéphrites aiguës* (glomérulonéphrites post-angineuses par exemple).

Dans les formes communes, la rétention uréique y est souvent modérée.

— *Néphropathies tubulaires* (intoxication mercurielle par exemple).

Au cours de la période anurique l'urée s'élève progressivement jusqu'au 5e jour pour atteindre 30 à 50 mmol/1. Lorsque la diurèse se rétablit, la baisse de

l'azotémie s'amorce lentement d'abord et rapidement ensuite, alors que l'urée urinaire remonte progressivement.

*1.3.2. **Azotémies** d'autres origines*

Avant d'affirmer le diagnostic de néphropathie chronique il est indispensable d'éliminer d'autres causes d'hyperazotémie.

Dans les azotémies, que l'on appelle à tort **extrarénales,** des étiologies multiples peuvent intervenir :

Simple oligurie, exagération de l'uréogénèse lors des grands catabolismes, hyperazotémie par manque de sel, obstacle mécanique sur les voies excrétrices, régime hyperprotidique.

1.3.3. Diagnostic étiologique d'une hyperazotémie chronique

1.3.3.1. Néphropathies interstitielles

Elles représentent 20 % des cas d'insuffisance rénale chronique et se traduisent par une hyperazotémie pure ou associée à une hypertension artérielle.

Elles s'observent :

- lors des syndromes de rétention vésicale (adénome prostatique, cancer de la prostate, prostatite chronique, tumeur du col) ;
- lors de la polykystose, de la lithiase, de la tuberculose uro-génitale, d'une tumeur vésicale, des compressions urétérales (cancer du col utérin).

1.3.3.2. Néphropathies glomérulaires

Elles représentent 30 % des cas et sont caractérisées par :

- une tendance aux œdèmes ;
- une évolution avec hypertension accompagnée de rétinopathie et de souffrance ventriculaire gauche ;
- une protéinurie ;
- une hématurie microscopique nette ;
- une cylindrurie inconstante.

tî.3.3.3. *Néphroangiosclérose*

Elle représente 15 % des cas et constitue une atteinte secondaire du rein, possible lors de l'évolution de toute hypertension. On constate alors :

- l'absence d'œdème ;
- une protéinurie discrète ;
- une hématurie peu importante.

1.3.3.4. Néphropathies diverses

Elles représentent 35 % des néphropathies ce sont :

- la maladie polykystique ;
- les atteintes rénales des connectivités telles que par exemple, lupus érythémateux, périartérite noueuse ;
- les atteintes rénales au cours de maladies métaboliques, goutte, dysglobulinémies (myélomes, maladie de Waldenstrôm).

1.4. Dosages de l'urée plasmatique et urinaire

Le prélèvement sanguin est effectué sur tube sec ou sur tube héparine.

1.4.1. Méthode à l'hypobromite

L'urée est traitée par une solution alcaline d'hypobromite de sodium, ce qui donne un dégagement d'azote qui est mesuré dans l'uréomètre et comparé à l'azote dégagé, dans les mêmes conditions, par une solution d'urée de titre connu.

La défécation du sérum est effectuée par une solution d'acide trichloracétique.

L'appareillage était représenté par l'uréomètre d'Yvon et une cuve à mercure.

Cette technique, applicable aussi bien au sérum qu'à l'urine n'est plus utilisée depuis longtemps, mais c'est elle qui a donné le nom d'azotémie au taux d'urée dans le sang.

1.4.2. Méthode à la diacétylmonoxime

La diacétylmonoxime en milieu acide et à chaud donne en présence d'urée une coloration jaune utilisée pour le dosage colorimétrique.

Cette méthode est souvent utilisée après déprotéinisation, mais elle peut aussi être utilisée directement. La parfaite proportionnalité entre l'absorbance et le taux de l'urée autorise l'emploi de 2 ou 3 étalons seulement.

1.4.3. Méthodes enzymatiques

1.4.3.1. Dosage enzymatique à l'uréase couplée à une réaction colorée

L'uréase hydrolyse l'urée en produisant de l'ammonium. Les ions ammonium réagissent en milieu alcalin avec du phénol et de l'hypochlorite pour former un indophénol coloré en bleu. La réaction est catalysée par le nitroprussiate, et l'intensité de la coloration formée est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon. La lecture est effectuée à 630 nm.

1.4.3.2. Dosage enzymatique à l'uréase. Détermination UV

$$\text{Urée} + H_2O \xrightarrow{\text{urease}} 2\,NH_3 + CO_2$$

$$\text{alpha-cétoglutarate} + NH_3 + NADH, H^+ \xrightarrow{\text{glutamo déshydrogénase}} \text{glutamate} + NAD^+ + H_2O$$

Dans les conditions opératoires choisies, la vitesse de disparition du NADH est proportionnelle à la concentration d'urée dans l'échantillon. La lecture est effectuée à 340 nm.

Cette technique peut être effectuée en cinétique ou en point final.

1.4.3.3. Dosage enzymatique à l'uréase. Appareils à électrode

L'uréase dégrade l'urée en NH_4^+ qui fait varier la conductivité. On mesure la cinétique de la variation de la conductivité avec une électrode sélective de conductivité.

1.4.3.4. Dosage enzymatique utilisant la chimie sur support solide

Les plaques sont constituées de plusieurs couches réactionnelles sur un support en polyester. La méthode analytique est basée sur l'hydrolyse de l'urée en présence d'uréase pour donner de l'ammoniac et du gaz carbonique. Une réaction colorimétrique permet de déterminer par réflectométrie la concentration en ammoniac produit.

Cette méthode analytique à l'avantage d'être spécifique, rapide et d'éviter l'utilisation de produits corrosifs ainsi que la déprotéinisation.

1.5. Répartition des techniques. Contrôle de qualité national

Les techniques enzymatiques représentent 83 % de toutes les méthodes utilisées, dont 2,6 % avec lecture colorimétrique, 80,4 % avec lecture en UV et 10,6 % avec lecture réflectométrique.

2. *Créatinine*

La créatinine plasmatique et urinaire est le reflet de la masse musculaire globale. Pour un sujet donné, le taux plasmatique et la quantité de créatinine éliminée quotidiennement dans les urines constituent des paramètres biologiques remarquablement fixes. Pour ces raisons, la valeur de la clairance de la créatinine revêt une signification séméiologique fondamentale lors de l'étude d'une

insuffisance rénale. La clairance de la créatinine est **indépendante de la diurèse, elle mesure directement la Hitration glomérulaire.**

Le taux plasmatique est indépendant de l'apport protéique alimentaire ; il reflète la masse musculaire du sujet et son métabolisme propre. L'élimination est exclusivement urinaire, et donc toute variation de la clairance renseigne directement sur l'état fonctionnel du rein.

2.1. Rappels physiologiques

2.1.1. Origine métabolique

La créatinine provient (figure 11.2) de la déshydratation de la créatine, elle-même présente dans le muscle strié où elle permet le stockage d'ATP sous forme de créatine phosphate ou phosphagène par une réaction catalysée par la créatine kinase (CK).

2.7.2. *Comportement de la créatinine au niveau du néphron*

La créatinine subit la filtration glomérulaire ; elle n'est par la suite ni réabsorbée ni excrétée au niveau du tubule. **Sa clairance mesure le volume du Hitrat glomérulaire formé par seconde.**

Clairance = 2 ml/seconde pour 1,73 m^2 de surface corporelle (voir tables des Dubois).

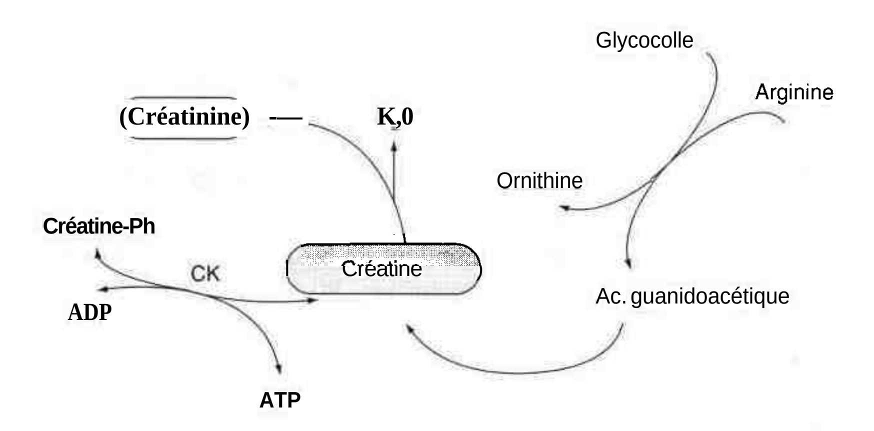


Figure 11.2 • Métabolisme de la créatinine.

2.2. Méthodes d'exploration

2.2.7. *Détermination de la créatinine sanguine*

Le sang total renferme de la créatine et de la créatinine. La créatine se trouve surtout dans les globules rouges à des taux faibles, alors que la créatinine est également répartie entre les globules et le plasma. La concentration en créatinine totale du sang est remarquablement constante chez un sujet donné, en fonction de sa masse musculaire. Elle ne dépend ni du régime, ni de l'exercice physique, ni même d'autres influences biologiques. C'est le constituant sanguin dont le taux est le plus fixe. La créatinine sanguine ne varie pratiquement que dans les lésions rénales.

Son taux varie, chez l'adulte, de 50 *à 105 pmol/l.*

2.2.2. ***Clairance***

Elle établit le rapport entre la quantité de cette substance apportée par le plasma au niveau du rein et la quantité de cette substance éliminée par le rein. **C'est le coefficient d'épuration plasmatique ou nombre de ml de plasma totalement épurés par le rein dans l'unité de temps.** Ce volume théorique s'exprime dans le cadre des unités SI en ml/seconde. Il est utile, pour manipuler simplement les clairances, de retenir que 24 h correspondent à 1 440 minutes et 86 400 secondes.

$$C = \frac{UV}{P}$$

C = clairance = volume de plasma totalement épuré.
U = concentration urinaire par litre.
P = concentration plasmatique par litre.
V = volume d'urines émises en une seconde (ou une minute).

Il suffit donc de doser la créatinine dans le plasma et dans l'urine, d'exprimer les résultats dans la même unité, de connaître la diurèse (débit urinaire) par seconde, pour calculer sa clairance. Il est essentiel au cours de l'épreuve (3 h ou mieux 24 h) de mesurer exactement la diurèse et de faire boire abondamment le sujet, afin d'avoir une diurèse supérieure à 1,5 1/24 h. La valeur normale est de 2 **ml/s.**

De plus la formule $C = \frac{UV}{}$ est valable pour le sujet adulte normal dont la surface corporelle est voisine de 1,73 m^2. Chez l'enfant et le nourrisson il faut tenir compte de la surface corrigée Se :

$$Ce = C \times \frac{1\ 73}{Se}$$

La Se est obtenue grâce aux tables de Dubois (figure 11.3) qui permettent, en joignant par une droite la taille et le poids, d'obtenir la surface corporelle recherchée à l'intersection avec la ligne des surface corporelles.

2.3. Signification des variations pathologiques

La créatinine plasmatique et urinaire, sa clairance, l'urée sanguine et urinaire et l'ionogramme plasmatique et urinaire sont les paramètres biochimiques fondamentaux de la pathologie néphrologique lors des insuffisances rénales. Ils sont difficiles à interpréter les uns sans les autres.

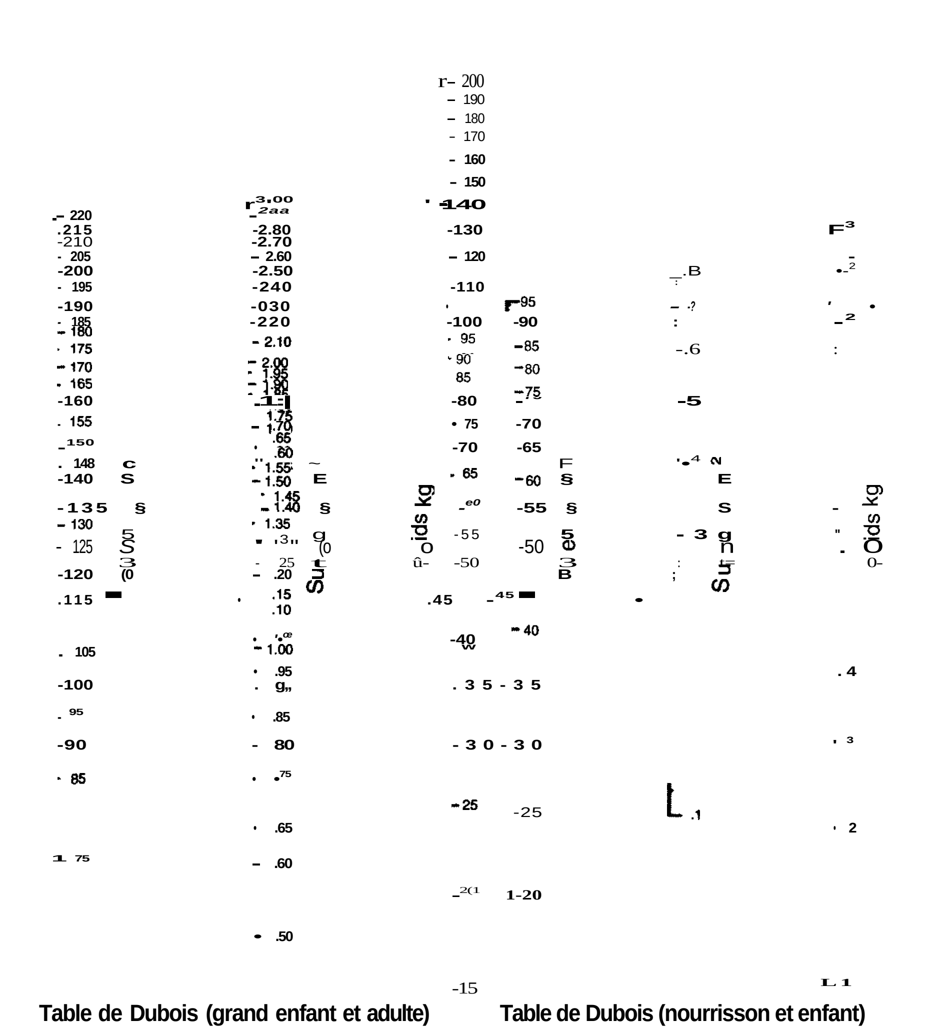


Figure 11.3 • Table de Dubois.

2.3.1. Valeur diagnostique dans le cadre du syndrome biologique de rétention azotée

Un taux d'urée sanguine entre 8 et 12 mmol/1 associé à une créatinine à 88 umol/l permet d'affirmer le caractère extra-rénal de cette azotémie. Par contre une urée à 17 mmol associée à une créatinine à 220 (J.mol/1 signifie une insuffisance rénale modérée. Une azotémie à 33 mmol/1 et une créatinine à 600 u,mol/l témoignent d'une insuffisance rénale avancée.

2.3.2. Valeur pronostique et surveillance de la thérapeutique

Tout au long de l'évolution d'une néphropathie, la valeur de la créatininémie et la clairance de la créatinine mesurent le degré d'insuffisance rénale et motivent de ce fait les attitudes thérapeutiques, alors que le taux d'urée sanguine et urinaire mesurent surtout le catabolisme azoté.

2.4. Méthodes de dosage

Le sérum ou le plasma sanguin peuvent être utilisés indifféremment.

Les échantillons de sérum ou de plasma ou d'urines peuvent être conservés plusieurs jours à l'abri de l'évaporation.

2.4.1. Réaction de Jaffé. Coloration picrique

Après défécation à l'acide trichloracétique, on utilise la réaction de Jaffé. La créatinine au contact d'un picrate alcalin donne une coloration orange. La créatine ne donnant pas cette réaction, la créatinine préformée est dosée seule. La lecture est effectuée à 510 nm.

On opère directement sur les urines, mais pour le sérum ou le plasma, sur un défécat trichloracétique en méthode manuelle.

Les analyseurs modernes peuvent mesurer à partir du sérum, plasma ou urines la cinétique d'obtention de la coloration.

On reproche à cette réaction de Jaffé son manque de spécificité. Les protéines, le glucose, l'acide ascorbique, les corps cétoniques peuvent en effet interférer sur la coloration.

Malgré ces réserves, le dosage colorimétrique de la créatinine est encore aujourd'hui très utilisé et satisfait les exigences de la clinique néphrologique.

2.4.2. Méthodes enzymatiques

2.4.2.1. Méthode enzymatique lecture UV

$$\text{Créatinine} \xrightarrow[\text{bactenenne}]{\text{créatininase}} \text{créatine} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{CK}} \text{créatine phosphate} + \text{ADP} + \text{phosphoénolpyruvate}$$

$$\text{Phosphoénolpyruvate} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{pyruvate kinase}} \text{pyruvate} + \text{ATP}$$

$$\text{Pyruvate} + \text{NADH,H}^+ \xrightarrow{\text{LDH}} \text{lactate} + \text{NAD}^+$$

La cinétique décroissante de disparition du NADH suivie à 340 nm est proportionnelle à la quantité de créatinine initiale présente.

2.4.2.2. Action d'une oxydase spécifique

$$\text{Créatinine} \xrightarrow[\text{créatininase}]{\text{Oxydase}} \text{Sarcosine} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{chromogène incolore} \longrightarrow H_2O + \text{chromogène coloré}$$

(4 aminophénazone acide 3-5 dichloro 2 hydroxybenzène sulfonique) — complexe quinone-imine rouge (absorbe à 520 nm)

2.4.2.3. Spectroréflectométrie

C'est le cas des appareillages de chimie sur support solide.

Exemple : *plaque « Vitras » de dosage enzymatique de la créatinine sur une seule plaque.*

La plaque contient une série de couches afin de réaliser une cascade de réactions enzymatiques. La créatinine est tout d'abord hydrolysée en créatine :

$$\text{Créatinine} + H_2O \xrightarrow{\text{créatininase}} \text{créatine}$$

$$\text{Créatine} + H_2O \xrightarrow[\text{amidinohydrolase}]{\text{créatine}} \text{sarcosine} + \text{urée}$$

$$\text{Sarcosine} + O_2 + H_2O \xrightarrow[\text{oxydase}]{\text{sarcosine}} \text{glycine} + \text{formaldéhyde} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{leucodérivé} \xrightarrow{\text{peroxydase}} \text{coloration proportionnelle à la concentration en créatinine.}$$

La créatine est alors hydrolysée en sarcosine, elle-même oxydée pour produire du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée). L'eau oxygénée, en présence de peroxydase, oxyde un leucodérivé qui se colore, et la vitesse de coloration est alors mesurée en cinétique par réflectométrie.

La vitesse de réaction est proportionnelle à la concentration de créatinine présente dans le sérum.

2.5. Contrôle de qualité national

2.5.7. *Techniques cinétiques directes*

Les techniques directes de dosage de la créatinine en cinétique représentent 85 % des participants.

2.5.2. *Technique enzymatiques*

Elle concernent essentiellement la réflectométrie (10,5 % des laboratoires).

3. Ammoniac

3.1. Origines biochimiques et destinées

L'ammoniac NH_3 est issu des réactions de désamination des aminoacides ou d'autres composés aminés. Il est donc d'origine endogène et exogène.

On distingue les **origines :**

- *intestinale* liée à l'activité métabolique de la flore bactérienne intestinale richement équipée en désaminases spécifiques ;

- *cellulaire* (principalement hépatique et rénale) où seule la désamination oxydative du glutamate par la L-glutamo-déshydrogénase est efficace, couvrant néanmoins l'ensemble du métabolisme des aminoacides grâce à la transamination sur l'oxo-glutarate qui fournit du glutamate qui sera donc lui-même secondairement désaminé. Le NH_3 formé lors de la désamination est aussitôt dissimulé, détoxiqué, sous forme de glutamine, acide aminé de transport et d'utilisation de l'ammoniac ;

- *rénale* où s'effectue une hydrolyse enzymatique de la glutamine faisant réapparaître le NH_3 (ammoniophanérèse) éliminé ensuite dans les urines sous forme de cation NH_4^+ (sels ammoniacaux urinaires).

Les destinées biochimiques, outre l'élimination urinaire, sont :

- *l'uréogénèse hépatique* arrêtant normalement tout ammoniac issu de la désamination intestinale. L'urée élimine ainsi, comme nous l'avons vu précédemment, deux molécules d'ammoniac dans sa structure chimique de diamide carbonique ;

- *l'utilisation anabolique* permet d'intégrer NH_3 dans des structures (biosynthèse des nucléotides puriques et pyrimidiques, biosynthèse de la glutamine, aminoacide commun des protéines).

3.2. Exploration

3.2.1. Prélèvement sanguin

II doit théoriquement être **artériel,** l'ammoniémie veineuse étant moins élevée en raison :

- de la fixation tissulaire périphérique d'ammoniac sous forme de glutamine ;
- de l'élimination rénale de sels ammoniacaux.

Toutefois, pour des raisons de commodité, le prélèvement veineux est le plus souvent utilisé.

Le sang doit être recueilli sur **tube héparine et conservé dans la glace** jusqu'au moment où il sera traité au laboratoire dans les **délais les plus brefs** (risque d'apparition de NH_3 de novo par désamination). Ainsi on considère que le temps écoulé entre le prélèvement et la centrifugation au laboratoire ne doit pas excéder 30 minutes.

La centrifugation devra être réalisée dans des conditions normales. Trop lente elle fournira un plasma riche en plaquettes et l'ammoniémie augmentera ; trop rapide, elle échauffera le plasma et le risque de désamination in situ s'élèvera.

Le dosage enfin devra être effectué dans les minutes suivant la centrifugation. Les plasmas trop hémolyses devront être rejetés.

3.2.2. Valeurs physiologiques de l'ammoniémie

Le taux normal de l'ammoniac libre du plasma est très faible : ***10 à 50 µmol/l.***

3.2.3. Ammoniurie

Après recueil des urines de 24 heures sur HC1 pour éviter la fermentation ammoniacale liée aux uréases bactériennes, les sels ammoniacaux peuvent être dosés grâce à la réaction colorée de Berthelot directement sur l'urine diluée.

Les valeurs physiologiques sont ***: 20 à 70 mmol/24 h.***

Des valeurs élevées sont observées lors des acidoses, en particulier rénales.

D'autre part, le dosage des sels ammoniacaux est indispensable pour la mesure, lors d'explorations fonctionnelles rénales, du débit des ions $H^{1"}$.

3.3. Variations pathologiques de l'ammoniémie

3.3.1. Chez le nouveau-né

L'élévation de l'ammoniémie signe habituellement une **anomalie congénitale portant sur l'une des enzymes impliquées dans le cycle de l'uréogénèse.** Les déficits congénitaux en carbamyl-phosphate synthétase et omithine-carbamyl transférase sont les plus sévères, conduisant le plus souvent le nouveau-né au décès dans un tableau clinique fait de coma, mouvement anormaux et troubles du tonus.

3.3.2. Chez l'adulte

Au cours des cirrhoses, les hyperammoniémies s'observent surtout lorsque l'hypertension portale ouvre des anastomoses portocaves. Dès lors l'absence ou F insuffisance d'épuration hépatique de l'ammoniac (devant être normalement incorporé dans l'urée), associée au shunt portocave explique son élévation dans le sang artériel.

À l'occasion des hémorragies digestives fréquentes chez ces malades (varices œsophagiennes), la désamination bactérienne intense des acides aminés de l'hémoglobine produit de grandes quantités d'ammoniac qui atteindront le cerveau et seront responsables de troubles neurologiques variables, de la simple obnubilation jusqu'au coma, réversibles lorsque l'ammoniémie s'abaissera. C'est la classique encéphalopathie portocave (figure 11.4).

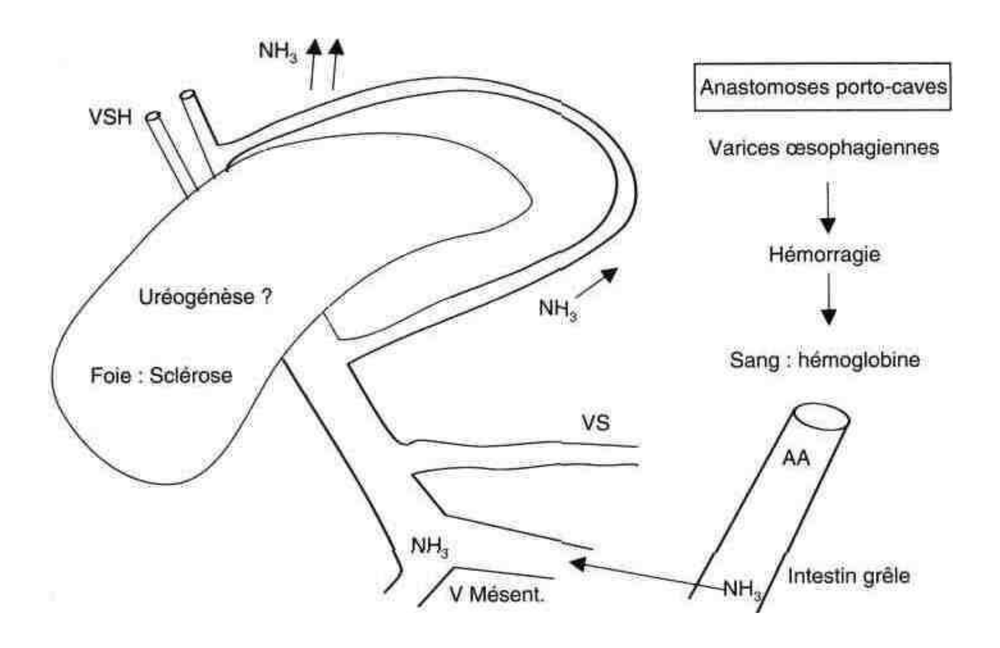


Figure 11.4 • Physiopathologie de F encéphalopathie portocave.

Dans la genèse des troubles de la conscience, interviennent, non seulement la toxicité propre de NH_3 mais aussi la déficience énergétique provoquée par le détournement de l'a-cétoglutarate du cycle citrique pour détoxiquer à tout prix l'ammoniac sous forme de glutamine non toxique, selon la réaction

Acide ct-cétoglutarique + 2 NH_3 glutamine.

Au cours des comas hépatiques, marquant souvent la fin des hépatites graves et des cirrhoses, l'hyperammoniémie accompagne le déficit en facteurs de l'hémostase et contribue à l'odeur particulière de l'haleine de ces patients. Elle participe par son taux très élevé au pronostic extrêmement fâcheux. En effet, hormis la greffe hépatique dans les hépatites aiguës fulminantes, il n'y a aucun traitement vraiment efficace actuellement.

3.4. Méthodes de dosage

3.4.1. Détermination calorimétrique

Elle peut être réalisée, en fonction des appareillages de deux manières différentes :

- sur plaque de « chimie sèche » dans les appareils « Vitros », la diffusion de l'ammoniac au travers d'un film de polypropylène dans une couche contenant un colorant (bleu de bromocrésol ou bleu de bromophénol) provoque une coloration dont l'intensité, mesurée par réflectométrie, est proportionnelle à la quantité d'ammoniac plasmatique ;
- la détermination colorimétrique traditionnelle, utilisable dans de nombreux automates multiparamétriques, repose sur la classique réaction de Berthelot, dans laquelle l'ammoniac développe, en milieu alcalin, une coloration bleue en présence de phénol et d'hypochlorite de sodium.

3.4.2. Dosage enzymatique

Le plus répandu il utilise la glutamo-déshydrogénase qui, en présence de $NADH,H^+$ transporte l'ammoniac sur l'a-cétoglutarate pour le transformer en glutamate, selon la réaction :

$$NH_3 + NADH + H^+ + \text{a-cétoglutarate} \xrightarrow{GLDH} NAD^+ + \text{glutamate.}$$

La décroissance de la densité optique à 340 nm, liée à la disparition du NADH, est proportionnelle à la quantité d'ammoniac présent.

4. Bilirubine

La dégradation du pigment porphyrinique de l'hémoglobine conduit aux pigments biliaires présents dans le plasma en petite quantité, à l'état normal, sous forme de bilirubine.

Son augmentation pathologique produit une coloration de la peau et des muqueuses, l'ictère. De multiples classifications des ictères ont été proposées, les plus récentes s'appuyant sur le siège et la nature du trouble métabolique responsable de l'hyperbilirubinémie.

4.1. Rappels biochimiques

4.1.1. Transfert hépatique

Au bout d'environ 120 jours, les globules rouges sénescents sont captés et hémolyses par les macrophages du système réticulo-endothélial. La globine subit une protéolyse, le fer est récupéré.

Issue de la dégradation de la porphyrine de l'hémoglobine, la biliverdine se transforme en bilirubine. La molécule de ce pigment rouge brun qui apparaît dans le sang de la veine splénique est la **bilirubine libre, non conjuguée,** insoluble dans l'eau et donc prise en charge par le transporteur non spécifique du plasma, la sérum-albumine.

La bilirubine née dans la rate parvient au foie par la veine porte ; celle qui est issue de la moelle osseuse, c'est-à-dire du territoire cave, rend compte de la fraction dosable dans le sang prélevé au pli du coude et parvient au foie, toujours fixée sur la sérum-albumine, par l'artère hépatique.

Une fraction mineure est issue du catabolisme hépatique de l'hème non érythropoïétique présent dans les cytochromes, catalase et peroxydases.

4.1.2. Métabolisme hépatique

Trois opérations se produisent (figure 11.5) dans l'hépatocyte pour traiter les 50 mmol de **bilirubine libre, non conjuguée,** formées chaque jour par un adulte sain :

- *captation* au pôle vasculaire ;
- *conjugaison glycuronique*, au niveau du reticulum endoplasmique, fixant soit une molécule de glycuronate (mono-glycuronide de bilirubine), soit surtout deux molécules (di-glycuronide). La conjugaison est le fait d'une glycuronyl-transférase. Elle entraîne une solubilité dans l'eau de la **bilirubine conjuguée ;**
- *sécrétion dans les canalicules biliaires.* La bilirubine conjuguée est alors devenue un pigment biliaire qui sera déversé dans l'intestin grêle, comme tous les éléments de la bile.

4.1.3. Sort intestinal

L'hydrolyse de la liaison de conjugaison affecte une partie mineure de la bilirubine conjuguée intestinale et libère de la bilirubine libre qui est réabsorbée **et** rejetée dans la circulation porte, réalisant **un cycle entéro-hépatique.**

La majeure partie de la bilirubine est transformée par la flore bactérienne intestinale en stercobilinogène et urobilinogène qui, oxydés en **stercobiline et urobiline,** donnent aux matières fécales leur coloration. Une petite partie est reabsorbée, passe ensuite dans les veines sus-hépatiques pour être finalement éliminée par le rein sous forme d'urobilinogène et d'urobiline, qui participent à la coloration normale des urines.

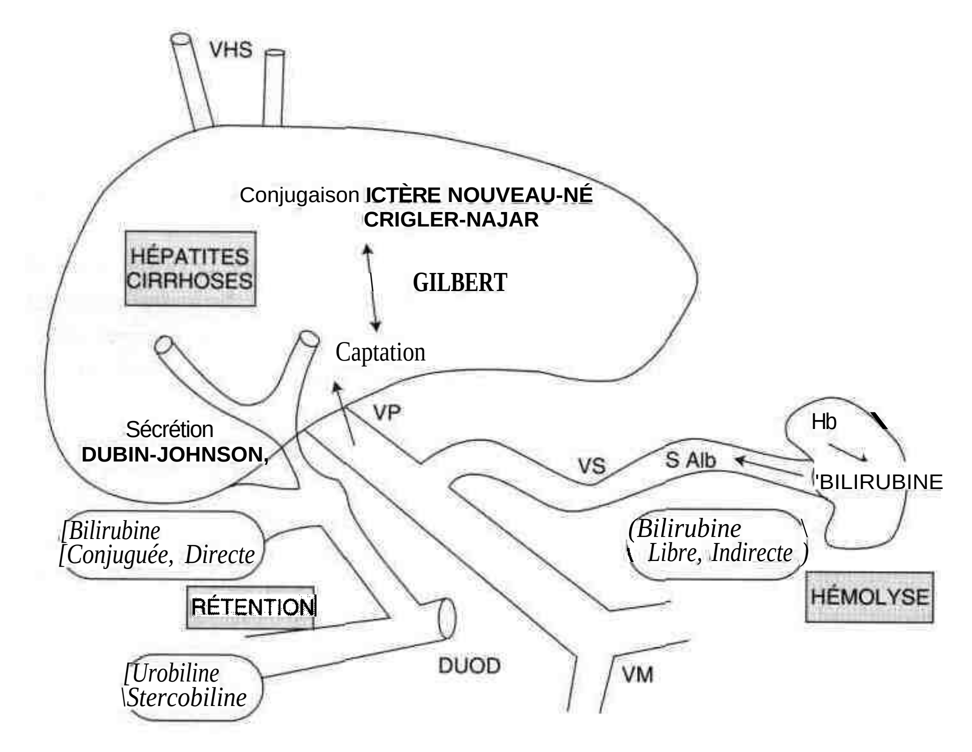


Figure 11.5 • Métabolisme de la bilirubine et physiopathologie des ictères.

4.2. Exploration

L'exploration est simple. Elle s'effectue par le dosage sérique de la bilirubine et de ses diverses fractions. Le dosage sanguin des sels biliaires (cholémie), ou leur recherche dans les urines, n'est en effet plus guère utilisé.

Le taux normal de bilirubine totale varie entre : *1,7et 20 µmol/l*.

Il n'y a pratiquement à l'état normal, que de la bilirubine indirecte dans un prélèvement de sang veineux au pli du coude, issue de la dégradation de l'hémoglobine dans la moelle osseuse.

4.3. Variations pathologiques

Elles concernent la pathologie en excès c'est-à-dire les ictères. Ils sont très divers et leur diagnostic étiologique est parfois difficile, s'appuyant sur une démarche toujours systématique (figure 11.6).

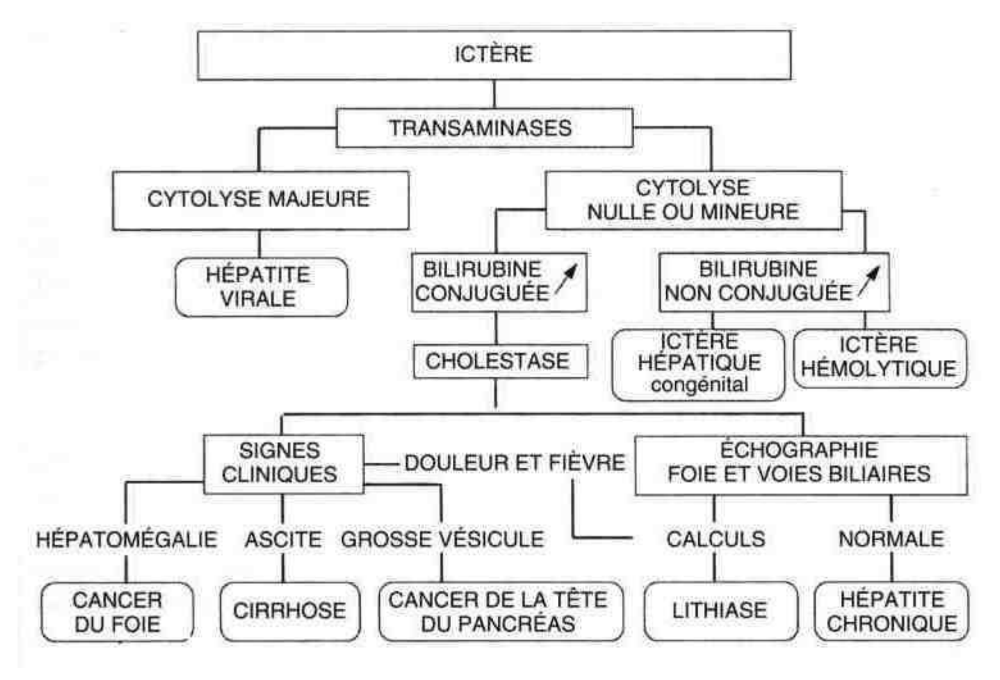


Figure 11.6 • La démarche diagnostique dans les ictères.

4.3.1. Ictères à bilirubine libre, non conjuguée ou indirecte

II s'agit le plus souvent d'une hyperproduction, c'est-à-dire d'une **hémolyse.** Parfois, l'ictère sera lié à un déficit en **glycuronyl-transférase.**

4.3.1.1. *Ictères hémolytiques*

L'ictère s'associe à une splénomégalie et à une anémie dans le cadre classique des **anémies hémolytiques.** L'ictère est généralement discret, sans décoloration des selles, mais parfois plus intense et la lithiase pigmentaire de la voie biliaire principale est à rechercher.

Les signes biologiques sont :

- élévation de la bilirubine libre au-dessus de 25 |J.mol/l :
- anémie normocytaire, avec diminution de la résistance osmotique ;
- hyper-réticulocytose traduisant le caractère régénératif ;
- effondrement de l'haptoglobine plasmatique.

Les étiologies sont représentées par :

- *Les anémies hémolytiques chroniques constitutionnelles avec :*

La maladie de Minkowski-Chauffard ou microsphérocytose héréditaire où l'anémie et l'ictère s'accentuent lors de poussées fébriles et où le traitement est la splénectomie.

Les maladies génétiques de l'hémoglobine, P-thalassémie homozygote, drépanocytose homozygote.

Les déficits enzymatiques érythrocytaires dont le plus fréquent est le déficit en glucose 6 phosphate déshydrogénase (G_6PDH).

- *Les anémies hémolytiques acquises* peuvent être d'origine immunologique, toxique, infectieuse ou mécanique par fragmentation érythrocytaire.

Les hémolyses allô ou iso-immunes s'observent essentiellement à la suite d'une transfusion sanguine incompatible et lors d'une grossesse compliquée d'une immunisation fœto-matemelle. Le diagnostic repose sur la mise en évidence d'une agglutinine irrégulière (anti D) chez la mère. Le risque majeur est la maladie hémolytique du nouveau-né chez lequel le risque d'ictère nucléaire, évité par exsanguinotransfusion, existe dès que la bilirubine sérique atteint 300 µmol/l.

Les anémies hémolytiques peuvent aussi être d'origine toxique (médicaments, toxiques industriels, métaux lourds, venins), infectieuse et parasitaire. Ce dernier groupe est dominé par le paludisme en particulier lors de l'accès pernicieux.

Les hémolyses par fragmentation érythrocytaire répondent à plusieurs causes : mécanique lors des prothèses valvulaires, traumatique après gros effort (hémoglobinurie), lors de microangiopathies chez l'enfant.

4.3.1.2. Déficit en glycuronyl-tranférase

L'ictère est isolé, sans splénomégalie ; les urines sont claires et les selles colorées.

Au plan biologique, le défaut de conjugaison hépatique se caractérise uniquement par l'hyper-bilirubinémie indirecte.

Les étiologies sont, suivant l'âge, très différentes (cf. figure 11.5) :

- *L'ictère du nouveau-né et du prématuré.* Il survient souvent vers le 2e ou le 3e jour, dure une semaine environ, est isolé et sans signification fâcheuse en dehors d'autre pathologie associée surtout chez le prématuré.
- *Les déficits congénitaux en glycuronyl-transférase.*

La maladie de Gilbert, déficit partiel en glycuronyl-transférase hépatique, est une affection fréquente à transmission autosomique dominante. Elle est souvent découverte à l'occasion d'un subictère conjonctival associé à une bilirubine indirecte élevée. Les tests d'exploration fonctionnelle hépatique sont normaux ainsi que l'hémogramme. Le pronostic à long terme est bon, il n'y a pas de traitement.

La maladie de Crigler-Najar est un déficit profond en enzyme de conjugaison, soit total (type I), soit incomplet (type II). Dans les deux cas il s'agit d'une affection sévère, dominée par le risque de complications neurologiques, particulièrement dans le type 1 où la bilirubine libre peut atteindre 700 ou 800 µmol/l.

4.3.2. Ictères à bilirubine directe. Ictères par rétention

Ils sont tous liés à un **syndrome de rétention biliaire,** ou cholestase.

Cliniquement, l'ictère est très sombre, parfois « vert bouteille », les urines

sont très foncées, presque noires, les selles sont blanchâtres, graisseuses, « mastic ».

Il y a une bradycardie et surtout un prurit, parfois féroce, avec lésions cutanées de grattage, dû à l'élévation concomitante des sels biliaires dans le sang. Il y a un gros foie de cholestase.

Biologiquement, l'hyperbilirubinémie porte presque exclusivement sur la fraction conjuguée ou directe qui peut atteindre des valeurs supérieures à 500 µmol/l. Les enzymes de cholestase, 7-GT, phosphatases alcalines, 5'nucléotidase, sont bien évidemment très augmentées. Il n'y a pas au début de réaction parenchymateuse d'insuffisance hépatique ni de cytolyse mais rapidement, du fait de la cholestase, les transaminases vont s'élever discrètement.

Les étiologies sont dominées par deux causes :

- *la lithiase biliaire* (ictère douloureux, fébrile, variable) ;
- *le cancer de la tête du pancréas ou des voies biliaires* (ictère classiquement indolore, apyrétique, constamment progressif) ;
- *les hépatites et les cirrhoses* ont aussi dans leur tableau biologique une élévation de la bilirubine conjuguée, liée à la cholestase intrahépatique, au niveau des canalicules biliaires, par l'œdème et l'inflammation. Cependant, il y a aussi parallèlement une élévation de la bilirubine libre.

4,3.3. Ictères à bilirubine mixte

Par leur fréquence, **les hépatites aiguës,** quelle que soit leur étiologie, et **les cirrhoses** d'origine éthylique, post-hépatitique, hémochromatosique ou biliaire primitive, constituent un groupe important où les deux fractions de la bilirubine sérique sont élevées.

La maladie de Dubin-Johnson est une affection congénitale rare de l'excrétion biliaire hépatocytaire où la bilirubinémie est mixte (environ 60 % de bilirubine conjuguée) avec des poussées d'ictère franc sur fond de subictère chronique, l'ensemble totalement sans gravité.

4.4. Méthodes de dosage

Prélèvement. Le prélèvement peut être du sérum ou du plasma après recueil sur héparinate de lithium. Il doit être conservé à l'abri de la lumière en raison de la sensibilité de la bilirubine à la photooxydation et le dosage pratiqué dans les 8 heures.

Principes généraux. Deux techniques différentes peuvent être en fait utilisées pour doser la bilirubine totale :

- *Spectrophotométrie directe.* Le sérum est dilué dans une solution de tétraborate de potassium de pH 9,3 puis l'absorbance est mesurée à 466 (correspondant à la bilirubine conjuguée et non conjuguée) et 522 nm pour éliminer l'interférence éventuelle de l'hémoglobine et des caroténoïdes.

- *Colorimétrie après diai.ota.tion.* Le diazo-réactif, l'acide sulfanilique diazoté, coupe la molécule de bilirubine en deux fragments dipyrroliques. Dans la technique de Jendrassik et Grof, la coloration obtenue est bleue à pH alcalin et rouge à pH neutre ou acide.

La réaction est instantanée avec la bilirubine soluble dans l'eau, conjuguée et dite « directe ». Une solubilisation est nécessaire pour la bilirubine libre, grâce au méthanol ou à des agents tels que caféine, benzoate de sodium, produits tensioactifs (Brij). Deux dosages, avec et sans adjuvant de solubilisation, permettent ainsi d'appréhender les deux formes principales directe et indirecte.

- *Bilirubine libre non liée à l'albumine.* En cas d'hémolyse majeure (incompatibilité fœto-matemelle par exemple), la bilirubine libre peut dépasser les possibilités de fixation de la sérum-albumine. Le risque de dépôt au niveau des noyaux gris centraux est alors réel et l'exsanguinotransfusion doit être réalisée avant. La mesure de cette variété de bilirubine libre nécessite une chromatographie sur Séphadex G25 qui retient le pigment non lié à l'albumine.

- *Delta-Bilirubine.* C'est une bilirubine libre liée covalentiellement à la sérum-albumine qui donne donc une réaction directe. La bilirubine directe est donc la somme suivante :

Bilirubine directe = bilirubine Delta + bilirubine conjuguée (c'est-à-dire l'ensemble des di-glycuronoconjugués et des mono-glycuronoconjugués). Le dosage de la bilirubine Delta est réalisé très facilement par les techniques de « chimie sèche » des automates Ortho (Vitros).

Donc la bilirubine totale est la somme des fractions suivantes :

Bilirubine totale = bilirubine Delta + bilirubine conjuguée + bilirubine non conjuguée.

5. *Acide urique*

L'acide urique est chez l'homme, qui a perdu l'uricase au fil de l'évolution, le terme du catabolisme des purines. Sa faible solubilité dans l'eau explique la pathologie de surcharge, observée au cours des très fréquentes hyperuricémies.

5.1. Rappels biochimiques et physiologiques

5.7.7. *Origines endogènes et exogènes de l'acide urique*

L'acide urique (figure 11.7) provient des **purines :**

- *exogènes,* issues de **l'alimentation** camée (viandes jeunes, abats, ris de veau);
- *endogènes.* Pour celles-ci, on peut ainsi envisager :

Une origine immédiate, proche, à partir des deux bases puriques des acides nucléiques, **adénine et guanine,** qui sont désaminées respectivement en

hypoxanthine et **xanthine** puis oxydées par la xanthine-oxydase en acide urique ou trioxypurine.

Une origine plus lointaine, dans laquelle la biosynthèse complète « *de novo* » des purines est concernée. Elle utilise des précurseurs non puriniques (amino-acides essentiellement) et s'appuie sur du ribose-phosphate ce qui explique la formation directe d'un nucléotide, **l'inosine 5'phosphate,** (IMP) en bout de voie métabolique. La régulation s'effectue sur l'enzyme amidotransférase intervenant dès le début de la biosynthèse.

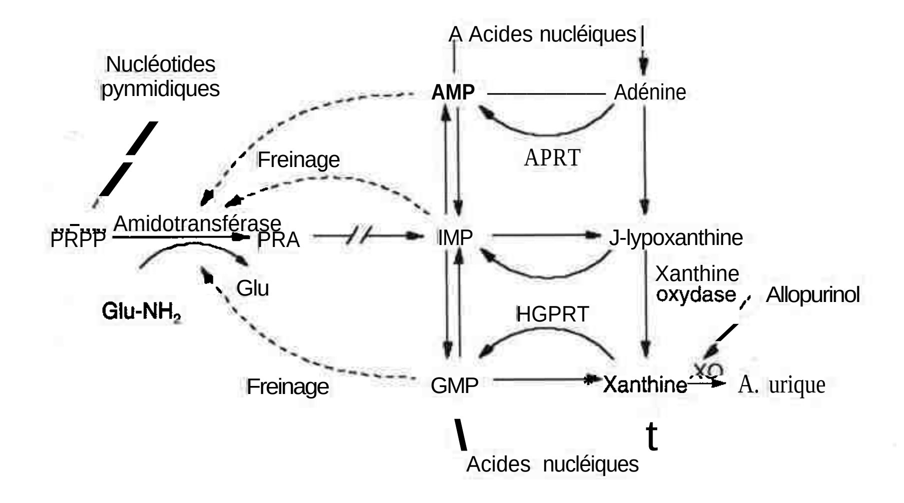


Figure 11.7 • Biosynthèse de l'acide urique (PRA = phosphoribosylamine).

La conversion de l'IMP en AMP et GMP procurera les nucléotides puriques à intégrer, sous forme de nucléotides triphosphates, dans les acides nucléiques de toutes nos cellules. IMP, AMP et GMP exercent une action inhibitrice sur l'enzyme amidotransférase.

Ils peuvent aussi être synthétisés directement à partir des bases libres, grâce aux enzymes APRT (adénine-phosphoribosyl transférase) et HGPRT (hypoxanthine, guanine-phosphoribosyl transférase).

5.1.2. État de l'acide urique

Dans le sang, l'acide urique se trouve sous forme libre, non nucléotidique, d'urate monosodique. Il est également présent dans les espaces interstitiels et l'ensemble de l'acide urique échangeable (avec de l'acide urique marqué par un isotope) ou pool miscible est d'environ 1,2 g (figure 11.8).

Même en cas de très forte hyperuricémie, la solubilité de l'acide urique est maintenue par la présence des protéines plasmatiques.

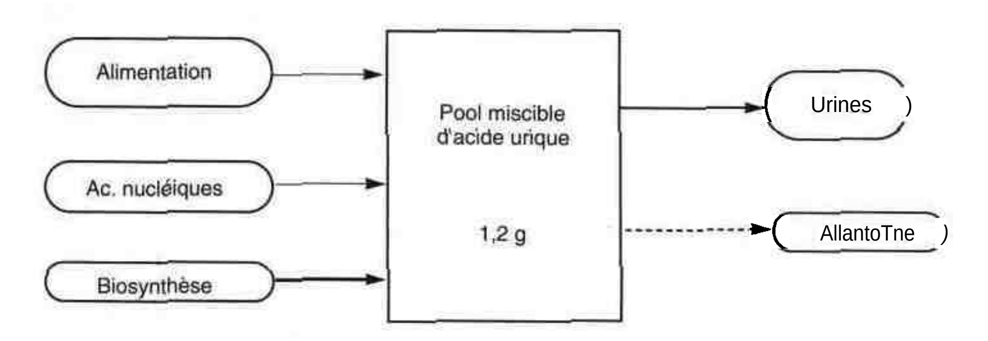


Figure 11.8 • Schéma métabolique de l'acide urique.

5.1.3. Élimination

En raison de l'absence d'uricase dans nos cellules, qui, chez tous les mammifères (sauf le singe et le chien de Dalmatie), ouvre le cycle de la trioxypurine et donne de l'allantoïne, l'acide urique est chez nous éliminé tel que, essentiellement par **voie urinaire.**

Après une filtration glomérulaire complète, une réabsorption également complète dans le tubule proximal, l'élimination n'est malheureusement que très partielle dans le tube distal. L'acide urique a donc une **clairance basse,** de l'ordre de 6 à 10 ml/mn, soit 0,10 à 0,16 mVs.

Le problème majeur est celui de sa solubilité dans l'urine car en milieu acide les urates repassent sous une forme non salifiée, encore moins soluble. Les hyperuricémiques ayant généralement une acidité urinaire élevée, on comprend ainsi la fréquence des précipitations d'acide urique responsables de **calculs des voies urinaires** (lithiase urique).

L'allantoïne est présente, à très faible taux, dans nos urines mais elle n'est que le résultat de l'action uricasique de la flore bactérienne intestinale.

5.2. Exploration

Elle est très simple, associant dosages sanguin et urinaire.

5.2.2. L'uricémie

Elle est plus élevée chez l'homme où les taux normaux vont de : ***200 à 420 pmol/l.***

L'uricémie de la femme est généralement comprise entre ***150 et 360 pmol/l.***

5.2.2. *L'uricurie ou uraturie*

Les taux des urines de 24 heures sont environ 10 fois les taux sanguins soit 7,5 *à 4,5 mmol/24 h.*

5.2.3. Clairance

Elle est basse : ***60 à 10 ml/mn*** soit : ***0,1 à 0,16 ml/s.***

5.3. Applications pathologiques — Hyperuricémies

L'augmentation du pool miscible et donc celle du taux sérique de l'acide urique sont extrêmement fréquentes chez l'homme (de 5 à 18 % dans les populations masculines des pays développés suivant les enquêtes).

5.3.7. *Étiologies des hyperuricémies*

Secondaires. Elles s'observent au cours des affections suivantes :

- *insuffisance rénale chronique ;*
- *grands catabolismes cellulaires ;*
- *tubulopathies.*

Primitives. Elle sont très fréquentes, parfois aggravées par des excès alimentaires et ce sont elles souvent qui sont révélées par des complications de surcharge.

5.3.2. *Manifestations cliniques*

Les complications des hyperuricémies sont liées au dépôt ou à la précipitation d'acide urique. On décrit des *complications rhumatologiques, urologiques et néphrologiques.*

La goutte se manifeste d'abord par des *crises aiguës* au niveau du pied et en particulier au niveau de la base du gros orteil. La crise inflammatoire est liée à la précipitation de cristaux d'acide urique dans la synoviale (arthropathie microcristalline).

Elle évolue ensuite parfois vers un stade subaigu où les crises inflammatoires peuvent toucher toutes les grosses articulations.

La goutte chronique enfin se caractérise par le *tophus,* concrétion sous cutanée d'acide urique amorphe, au niveau des tendons extenseurs, du pavillon de l'oreille, qui peut aussi se former dans les os au voisinage des articulations et la goutte devient alors une polyarthropathie chronique inflammatoire.

La lithiase rénale, due à la présence de calculs uriques dans les voies excrétrices rénales se traduit inévitablement par des *coliques néphrétiques,* itératives, sans tendance à l'infection ni à la stase. Les calculs uriques sont radio-invisibles, mais l'uraturie forte ou normale a la particularité d'être accompagnée

d'une acidité urinaire importante qu'il convient d'atténuer par la prise de boissons alcalines (eaux bicarbonatées).

La néphropathie urique est due à des *dépôts d'acide urique* au niveau des pyramides des reins. Elle est liée directement à l'hyperuricémie et toute apparition d'hématurie microscopique au culot, toute élévation de la tension artérielle doivent entraîner la prescription de freinateurs de la synthèse urique, abaissant l'uricémie au-dessus d'un seuil de sécurité (400 µmol/l) avant que ne s'installe une *insuffisance rénale chronique.*

5.4. Méthodes de dosage

5.4.1. Méthodes enzymatiques

Elles reposent toutes sur la destruction spécifique de l'acide urique par l'uricase, selon la réaction suivante :

$$\text{Acide urique} + 2H_2O \longrightarrow \text{allantoïne} + CO_2 + H_2O_2.$$

5.4.1.1. Dosage de H_2O_2 formée

Il peut être réalisé avec une catalase ou avec une peroxydase :

Avec une catalase et en présence d'éthanol, il y a formation d'acétaldéhyde que l'on peut doser à l'aide :

- d'une aldéhyde déshydrogénase avec formation de NADH et d'acétate (technique de Haeckel avec lecture à 340 nm) ;
- d'une alcool déshydrogénase en présence de NADH. Il y a formation d'éthanol et de NAD^+ et la diminution d'absorbance est encore lue à 340 nm (technique de Trivedi).

Ces techniques, utilisant le couple uricase-catalase, sont employées par 10,8 % des laboratoires.

Avec une peroxydase, selon la technique de Trinder, avec oxydation d'un chromogène incolore en produit coloré.

Malgré les interférences, cette technique est **la** plus populaire avec 84 % d'utilisateurs.

5.4.1.2. Méthodes spectrophotométriques

On détermine avant et après action de l'uricase l'extinction à 293 nm. L'acide urique présente un pic d'absorption maximale à cette longueur d'onde et pas l'allantoïne. La technique est encore employée par 3,6 % des laboratoires.

Références bibliographiques

Annales du contrôle de qualité national, *Agence du Médicament,* 1998 **et** *AFSSAPS,* 1999.

S. Bernard, *Révisions accélérées* ***en biochimie*** *clinique,* Maloine, Paris, 1982.

J.P. Borel et al, *Biochimie pour le clinicien. Mécanismes moléculaires et chimiques à l'origine des maladies,* Prison-Roche, Paris, 1999.

J. Frexinos, *Hépato-gastm-entérologie clinique,* Simep, Villeurbanne, 4" éd., 1992.

P. Métais et al., *Biochimie clinique,* tome **1,** 2e éd., Simep, Paris, 1990.

P. Métais et al., *Biochimie clinique,* tome 3, Simep, Paris, 1988.

G. Siest et al.. *Références en biologie clinique,* Eisevier, Paris, 1990.

12

Exploration fonctionnelle hépatique

Pierre Valdiguié

L'importance physiologique et métabolique du foie, la fréquence des atteintes hépatiques ou hépatobiliaires expliquent le caractère fondamental et l'intérêt de l'exploration biologique de cet organe.

Le choix et la sélection de tests sensibles et spécifiques peut paraître difficile au milieu de la foule de tests hépatiques disponibles mais la simplification est facile.

Elle s'impose d'autant plus que la demande de prescription biologique des patients vis-à-vis de leur médecin est abusive, le foie étant considéré en France comme un organe particulièrement fragile et sensible, responsable d'un grand nombre de malaises.

1. Rappel des grandes fonctions hépatiques

1.1. Fonction excrétrice

7.7.7. *Fonction biliaire*

Elle s'apprécie par le dosage des :

- **pigments biliaires.** Bilirubine essentiellement dans le sang, urobilinogène et urobiline dans les urines ;
- **sels biliaires,** pouvant être recherchés facilement dans les urines grâce à leur action tensio-active (reaction de Hay à la fleur de soufre) ou dosés dans le sang sous le nom de cholémie ;
- **enzymes de cholestase.** Ce sont essentiellement les phosphatases alcalines, la "/-glutamytransférase et la 5' nucléotidase.

1.1.2. Fonction d'épuration plasmatique

Elle peut être étudiée par :

- **l'ammoniémie** qui représente aussi la fonction métabolique d'uréogénèse ;
- **l'épreuve à la BSP** (bromosulfone-phtaléine) qui est encore parfois pratiquée. Elle consiste à mesurer dans le plasma la disparition du colorant (par photométrie après alcalinisation) injecté par voie veineuse sous forme d'une solution à 30 mg/ml, à la dose de 150 mg/m^2 de surface corporelle. *Les prélèvements sanguins sont réalisés 15 mn et 45 mn après l'injection (protocole de Rosenthal)* ou après 8, 15, 45, 90 et 120 mn (clairance de la BSP, normalement de 0,12àO,18mVmn).

Dans l'épreuve simple les taux de colorants ne doivent pas dépasser *25 % à 15 mn et 5 % à 45 mn,* ce dernier chiffre étant parfois seul pris en compte.

1.1.3. Fonction de détoxication et de conjugaison

Diverses fonctions chimiques sont utilisées par l'hépatocyte pour assurer ces fonctions fondamentales, rarement explorées maintenant.

Citons par exemple les fonctions suivantes :

- *fonction NH_2 du glycocolle* détoxicant l'acide benzoïque sous forme d'acide hippurique ;
- *fonction acide du sulfate* se combinant à divers hormones ;
- *fonction aldéhyde du glycuronate* conjuguant des hormones stéroïdes ou la bilirubine.

1.2. Fonctions métaboliques. Recherche de l'insuffisance cellulaire

1.2.1. Métabolisme glucidique

La glycémie seule appartient à ce chapitre. Toutefois sa baisse profonde ne s'observera qu'au cours des grandes destructions du foie.

7.2.2. Métabolisme protéique

Le dosage des protéines totales et mieux celui de **la sérum-albumine** apprécie les possibilités de biosynthèse hépatique.

Les **"y-globulines** sont élevées dans la plupart des cas de cirrhose alcoolique, d'hépatite chronique active et de cirrhose biliaire primitive.

Les globulines α_1 et α_2 sont augmentées en cas de tumeurs malignes. Ainsi s'explique l'intérêt de **l'électrophorèse des protéines sériques** si l'on soupçonne une hépatopathie chronique.

L'étude **des facteurs de la coagulation** et du complexe prothrombinique en particulier est un temps important dans la recherche d'une insuffisance cellulaire hépatique.

Le temps de Quick ou **taux de prothrombine** est allongé en cas de cholestase et d'insuffisance hépatocellulaire. Le dosage des facteurs II, V (proaccélérine), VII (proconvertine) ou X (Stuart) peut aussi être demandé.

1.3. Recherche d'une cytolyse

L'apparition dans le plasma d'enzymes comme les **transaminases.** la TGP ou ALAT ou alanine-aminotransférase en particulier, comme l'OCT ou omithine-carbamyl transférase, comme la choline-estérase ou encore la LDH, signe la destruction des hépatocytes ou tout au moins d'importants troubles de la perméabilité cellulaire.

Le **fer sérique** élevé témoigne aussi d'une cytolyse hépatique.

1.4. Tests divers

Selon l'état clinique des patients, d'autres examens sont souvent nécessaires, en particulier immunologiques.

Ainsi la recherche des **antigènes du virus de l'hépatite B et l'étude des anticorps** ***anti-Hbs, anti-Hbe ou anti-Hbc*** sont-elles fondamentales au cours de l'évolution de ce type d'hépatite, alors que pour l'hépatite C, ce seront les anticorps anti-VHC.

Ailleurs ce sera le dosage de **l'a-fœtoprotéine** qui sera important, accompagnant une échographie hépatique.

Enfin dans certains cas seule **l'histologie donnera des renseignements** valables après ponction-biopsie du foie.

2. *Choix des tests hépatiques indispensables*

Nous venons de voir que de nombreux examens biologiques d'exploration hépatique ont été proposés. Cependant un petit nombre peut être retenu, comportant des tests suffisants et nécessaires qui doivent donc être systématiquement effectués chez tout malade suspect d'une maladie du foie ou de la voie biliaire principale.

2.1. Dosage de la bilirubine sérique

Cet examen (cf. chapitre 11, Constituants azotés non protéiques) permet de reconnaître une hyperbilirubinémie modérée car le subictère n'est cliniquement perceptible, à la lumière du jour, qu'à partir de 25 ou 30 µmol/l de bilirubine *(valeurs usuelles de 1,5 à 20* ***µmol/l).***

Le dépistage portera surtout sur la fraction libre, non conjuguée ou indirecte témoignant alors d'une hyperhémolyse ou d'une maladie de Gilbert.

2.2. Détermination de l'activité des transaminases

Ces enzymes (cf. chapitre 10, Enzymes plasmatiques), ***(valeurs usuelles de 5 à 50 Vil à** 37 °C),* n'ont pas de spécificité hépatique particulière.

Toutefois une élévation de la TGP ou ALAT (alanine aminotransférase) signe une *cytolyse hépatique.* Cela s'observera donc dans toutes les hépatites aiguës, virale, toxique, médicamenteuse, au cours de la nécrose ischémique du foie ou de l'insuffisance cardiaque sévère, de l'hépatite chronique active.

Dans *l'hépatopathie alcoolique subaiguë,* la TGO ou ASAT (aspartate aminotransférase) est généralement plus élevée que la TGP.

2.3. Mesure de l'activité de la "/-GT

La "y-GT ou γ-glutamyl transférase ***(valeurs usuelles de 5 à 80 VU à** 37 °C)* est augmentée dans tous les cas d'hépatite aiguë ou chronique (avec les transaminases), dans la cholestase (avec les phosphatases alcalines), dans *l'alcoolisme chronique, dans les métastases* où elle constitue classiquement un marqueur précoce.

Son élévation modérée est aussi observée à l'occasion de la prise de nombreux médicaments et enfin parfois aussi chez des sujets parfaitement normaux, dès lors longtemps accusés d'intempérance !

2.4. Détermination de l'activité des phosphatases alcalines

Leur élévation ***(valeurs usuelles de 30 à 125 Vil à** 37 °C)* est un bon signe de *cholestase* (avec la 'y-GT). L'origine osseuse, ostéoblastique, doit parfois être recherchée chez certains patients atteints d'*ostéomalacie ou de maladie de Paget* ou parfois même d'hyperparathyroïdie.

La séparation des activités hépatique et osseuse peut être réalisée par inactivation thermique à 56 °C des enzymes d'origines osseuse ou par électrophorèse des isoenzymes.

2.5. Électrophorèse des protéines sériques

Elle est utile dans les *hépatopathies chroniques où* les •v-globulines sont élevées : bloc β-γ des cirrhoses, augmentation dans les hépatites chroniques actives, les *cirrhoses biliaires primitives.*

L'albumine, les α_1 et α_2 sont à considérer lors du diagnostic des *métastases* en particulier après des cancers digestifs.

2.6. Autres analyses

Elles n'ont qu'un intérêt limité honnis quelques cas particuliers comme l'étude des **facteurs de l'hémostase ou du temps de Quick** dans la grande insuffisance hépatique précédant le coma.

De même l'étude de **l'élimination de la BSP** est un bon test général d'intégrité hépatique mais il est redondant avec l'une ou l'autre des analyses précédemment citées.

Enfin n'oublions pas que l'intérêt des tests biologiques s'efface souvent devant d'autres examens paracliniques tels **qu'échographie** (pour le dépistage des métastases) ou **examen histologique** après ponction-biopsie (pour préciser le caractère agressif d'une hépatite chronique par exemple).

La **conduite à tenir** est donc simple. En effet si les 4 ou 5 tests ci-dessus sont *normaux,* il n'y a alors pas de *lésion du foie.*

Si deux au moins sont perturbés, il y a vraisemblablement *une maladie du foie ou de la voie biliaire principale* et une deuxième série d'analyses plus spécifiques devra être alors entreprise.

Quelques exemples de pathologie courante serviront à illustrer ces **propos.**

3. *Quelques applications cliniques*

3.1. « Crise de foie »

Parfaitement connue de tous cette manifestation bien banale associe des céphalées, des nausées ou vomissements, une haleine nauséabonde et une langue blanche.

Le foie est, dans notre pays, responsable de ces maux alors qu'il ne l'est pas en Belgique ou en Suisse francophones.

L'exploration biologique, si elle est réalisée, est toujours normale et il faut donc rechercher une autre étiologie, sous réserve d'avoir cependant éliminé toute pathologie lithiasique de la vésicule biliaire :

- **les migraines** avec ou sans manifestations digestives associées sont souvent responsables de cette séméiologie. Il s'y associe volontiers des signes neurologiques hémilatéralisés et une photophobie ;
- **les gastrites aiguës,** avec ou sans stase, s'accompagnent souvent de crises dyspeptiques analogues ;

l'allergie alimentaire ou toxique est aussi souvent en cause pour les ali-

ments très divers (œufs, chocolat, lait, etc.). L'alcool éthylique doit **pouvoir être** rangé dans cette catégorie et dans la précédente (gastrite associée).

- **les colopathies fonctionnelles** peuvent donner une séméiologie voisine.

3.2. Ictère

Dans tout ictère, quelle qu'en soit sa cause, l'exploration fonctionnelle hépatique sera perturbée. Les examens à prescrire seront :

- **bilirubine directe et indirecte ;**
- **transaminases** (TGP surtout). L'élévation de la TGP traduira en effet très rapidement l'intensité de la souffrance hépatique devant la cholestase ;
- les enzymes de cholestase seront très élevés bien évidemment.

La démarche étiologique pourra s'appliquer, selon l'algorithme ci-contre (cf. aussi figure 11.6).

Dans cet ensemble, les étiologies sont dominées , au plan de la fréquence, par ***les ictères par rétention, d'origine calculeuse ou néoplasique et par les hépatites d'origine virale.***

Dès lors des analyses spécifiques doivent être demandées en particulier pour les *hépatites B,* qui permettront de guider diagnostic et pronostic :

Ag Hbs ——————> Infection en cours (ou porteur sain).
Ac Anti-Hbs ——————> Guérison. Sujet protégé.
Ag Hbc ——————> Non décelable dans le sang.
Ac Anti-Hbc ——————> à IGM infection en cours.
à IGG infection ancienne.
Ag Hb e——————> Infection très intense.
Ac Anti-Hbe ——————> Pronostic ???

Pour les hépatites C la recherche d'anticorps anti-VHC doit conduire, si elle est positive, à une étude de la virémie par biologie moléculaire.

33. Gros foie

Les signes biologiques à utiliser en première intention sont ceux de la cholestase ou de la cytolyse.

Les mesures d'activité **des phosphatases alcalines, de la γ-GT et de la TGP** seront donc nécessaires.

Les étiologies devront être recherchées parmi les causes suivantes : cirrhoses, cancer secondaire du foie, insuffisance cardiaque congestive, infestations parasitaires ou maladies du sang.

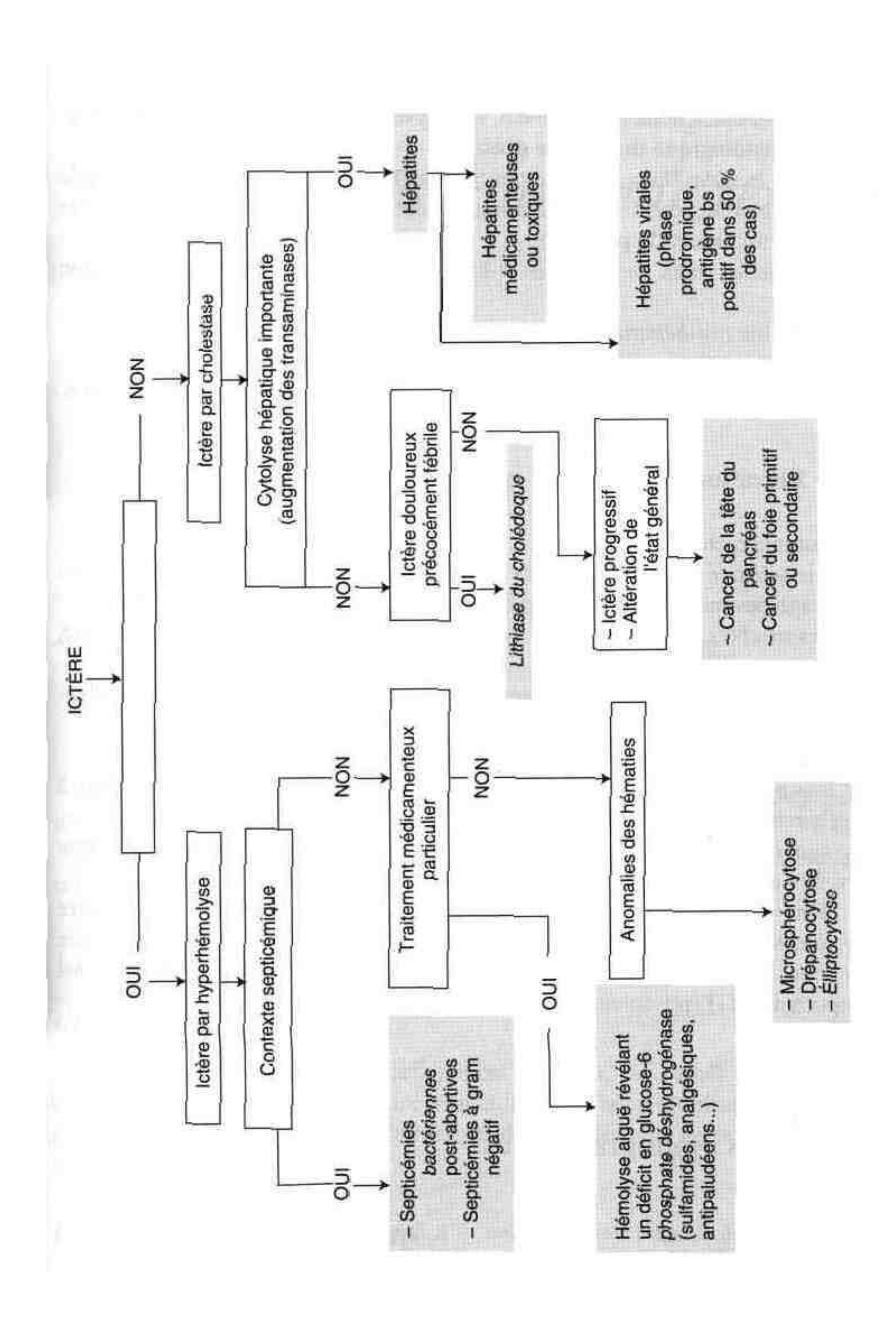


Figure 12.1 • Schéma algorithmique pour le diagnostic des ictères.

3.4. Ascite

Devant cet épanchement péritonéal, l'analyse fondamentale est **l'examen chimique et histologique du liquide d'ascite.**

Ainsi un *exsudât* (taux de protéines > 25 g/1) traduit une irritation péritonéale directe et le diagnostic est malheureusement le plus souvent un cancer de l'ovaire ou un cancer du péritoine.

Un *transudat* (taux de protéines < 25 g/1) s'observera lors de l'hypertension portale :

- *d'origine pré-hépatique :* compression ou phlébite de la veine porte ;
- *d'origine hépatique :* cirrhoses essentiellement ;
- *d'origine post-hépatique :* insuffisance cardiaque ou péricardite constructive.

3.5 Élévation isolée de la γ-glutaml-transférase

II faut rechercher avant tout :

- *une intoxication alcoolique* (examen clinique, VGM, C.D. transferrine, test de sevrage devant entraîner très rapidement une chute du taux de la γ-GT) ;
- *des troubles nutritionnels ou métaboliques* tels que dyslipidémies, diabète, **etc.;**
- *une hépatotoxicité médicamenteuse* (contraceptifs stéroïdiens, antiépileptiques, etc.).

Sinon **envisager** en deuxième lieu :

- *une affection hépatobiliaire* jusque-là latente sans oublier l'échographie à la recherche d'une métastase ;
- *une parasitose, une dysthyroïdie, une cirrhose biliaire primitive* doivent aussi être évoquées ;
- dans 1 à 5 % des cas enfin il faut savoir **qu'aucune étiologie ne peut être retenue.** Malgré l'inquiétude des patients, le diagnostic de normalité peut être maintenu sous réserve d'une surveillance biologique régulière, 2 fois par an, comportant γ-GT, phosphatases alcalines et transaminases.

Références bibliographiques

J.P. Benhamou et S. Erlinger, *Maladies du foie et des voies biliaires,* Flammarion Médeciné Sciences, Paris, 4e éd., 2000.

î. Frexinos, *Hépato-gastro-entérologie clinique, 4° éd.,* Masson, 1992.

P. Métais et Al., *Biochimie clinique,* tome 2, Simep, 1980.

G. Siest et Al., *Références en Biologie clinique,* Eisevier, Paris, 1990.

13

Exploration fonctionnelle rénale

France de La Farge

1. Introduction

L'urine définitive resuite des deux mécanismes suivants :

- *la filtration glomérulaire ;*
- *la réabsorption et la sécrétion tubulaires.*

Mais avant d'envisager une *exploration fonctionnelle rénale fine*, il faut parler d'une exploration fonctionnelle rénale globale et courante.

Tout examen clinique comporte un interrogatoire, un examen physique et enfin un examen des urines au cabinet même du médecin.

1.1. Examen des urines au cabinet du médecin

1.1.1. Examen macroscopique

Normalement les urines sont parfaitement limpides. Des urines anormalement colorées doivent faire penser à une hématurie, une hémoglobinurie, une myoglobinurie ou bien la prise d'aliments ou de médicaments colorant anormalement les urines.

1.1.2. Examen par les bandelettes

II remplace la recherche de glucose par la liqueur de Fehiing ou d'une protéinurie par la chaleur en présence d'acide acétique. Les bandelettes sont constituées par un support plastique rigide sur lequel sont fixées des plages réactives distinctes. Ces zones réactives sont stables et prêtes à l'emploi.

Les différents paramètres que l'on peut apprécier actuellement sont les suivants : pH, densité, sang, protéines, glucose, corps cétoniques, bilirubine, urobilinogène, nitrites et leucocytes pour dépister une infection urinaire.

Pour obtenir des résultats optimaux, il convient d'utiliser une urine fraîche, en recueillant les urines après la toilette génitale et au milieu du jet. Le temps de lecture varie entre 0 et 60 secondes. Un examen négatif permet de ne pas poursuivre l'exploration. Toute anomalie impose une confirmation par des examens de laboratoire.

1.2. Examens biochimiques de routine

1.2.1. Urines

Tous les examens doivent être effectués **sur des urines de** 24 **heures.**

1.2.1.1. Protéinurie

Son dépistage repose sur l'usage des bandelettes reactives et son dosage est effectué à l'aide d'acide sulfosalicylique, d'acide perchlorique ou de colorants sur des urines de 24 heures. Les résultats sont exprimés en grammes/24 heures. (Cf. chapitre 9).

Les protéinuries sont généralement permanentes. Elles peuvent être intermittentes, c'est le cas des protéinuries d'effort et surtout de la protéinurie orthostatique fréquente au cours de l'adolescence.

L'étude qualitative est réalisée par électrophorèse ou bien par immuno-fixadon, parfois après concentration des urines.

On distingue :

- *la protéinurie physiologique* **inférieure à 150** mg/24 **h,** contenant 2/3 de globulines et peu d'albumine ;
- *les protéinuries tubulaires :* rares, avec peu d'albumine ;
- *les protéinuries glomérulaires* ; elles peuvent être sélectives, faites de 80 % d'albumine ou non sélectives, avec toutes les fractions protéiques du plasma ;
- *les protéinuries monoclonales* témoignant de la présence d'une globuline anormale dans les urines migrant en position a ou p. La plus fréquente est la protéinurie de Bence Jones.

1.2.1.2. Electrolytes

Les variations sont considérables d'un jour à l'autre en fonction des apports. Les dosages les plus fréquents sont Na$^{4'}$ et K$^{'1'}$.

Normalement Na/K > 1. Si Na/K < 1, il faut penser à une réaction d'hyperaldostéronisme.

1.2.1.3. Constituants azotés (cf. chapitre 11).

▶ URÉE-

sa concentration par litre interprétée par rapport au taux d'urée plasmatique renseigne sur le pouvoir de concentration du rein. Le rapport Urée urinaire/Urée plasmatique est habituellement supérieur à 20. Le débit uréique par 24 heures renseigne sur la ration azotée alimentaire.

> CRÉATININE:

son taux d'excrétion par 24 heures est constant d'un jour à l'autre, il reflète le catabolisme musculaire. Sa mesure est nécessaire à la détermination de la clairance de la créatinine.

▶ ACIDE URIQUE:

le dosage est justifié en cas de goutte et de lithiase urique.

1.2.1.4. Éléments cytobactériologiques

▶ HÉMATIES:

dans une urine normale, on doit trouver moins de 5 hématies par mm^3 ou 5 000/ml.

▶ LEUCOCYTES-

l'urine normale ne doit pas contenir de **leucocytes ou tout au** moins ne doit pas dépasser 10 000 leucocytes/ml.

▶ CYLINDRES:

ils sont constitués d'une protéine d'origine tubulaire. Les cylindres protéiques ou acellulaires ont peu de signification pathologique.

Au contraire les cylindres hématiques indiquent que l'hématurie vient du parenchyme rénal, en particulier des glomérules.

Les cylindres leucocytaires représentent un état inflammatoire du parenchyme rénal.

▶ LES CRISTAUX **n'ont pas de signification pathologique.**

▶ LES CELLULES ÉPITHÉLIALES **n'ont qu'une valeur séméiologique mal définie.**

▶ LA PRÉSENCE DE GERMES **à l'examen direct nécessite une uroculture.**

1.2.2. Sang, plasma, sérum

1.2.2.1. Déchets azotés

- La créatinine plasmatique : ce dosage est celui qui permet d'apprécier le plus facilement la valeur de la fonction rénale. Le taux plasmatique est

remarquablement fixe pour un individu donné car il dépend uniquement de l'importance de la masse musculaire et de la fonction rénale. Le taux est indépendant du volume des urines et du régime alimentaire.

- L'urée sanguine ; son taux dépend certes de la fonction rénale mais aussi du volume de la diurèse et de la teneur en protéines du régime alimentaire. Ce dosage doit être remplacé par celui de la créatinine plasmatique pour apprécier la fonction rénale.

- L'acide urique : valeurs normales de 250 à 420 u,mol/l. Son taux s'élève *chez le goutteux* et aussi en cas d'insuffisance rénale.

1.2.2.2. lonogramme sanguin :

Na'1", K^+, Cl", bicarbonates. Leur étude est indispensable pour tout désordre hydroélectrolytique avec ou sans insuffisance rénale. Le K^+ s'élève beaucoup en cas d'insuffisance rénale et plus particulièrement en cas d'anurie.

1.2.2.3. Équilibre phosphocalcique (cf. chapitre 3) :

- examens sanguins : calcium, phosphore, phosphatases alcalines ;
- examens urinaires : calcium, phosphore ;
- rein, os et intestin participent au métabolisme phosphocalcique.

1.2.2.4. Équilibre lipidoprotidique (cf. chapitre 7)

Au cours des syndromes néphrotiques, si la protéinurie est supérieure à 4 g/24 h, on note :

- une baisse des protides totaux inférieure à 60 g/1 avec baisse de l'albumine < à 30 g/1 ;
- une élévation des α_2-β globulines et une baisse des y globulines ;
- une hyperlipémie mixte avec un cholestérol à 10 mmol/1 et des triglycérides à 4 mmol/1.

2. *Notions de clairance*

La clairance d'une substance éliminée par le rein se définit comme le volume de plasma épuré totalement de cette substance dans l'unité de temps. Plus la clairance est élevée plus le « pouvoir d'épuration » du rein pour la substance considérée, est grand.

La clairance rénale est établie facilement pour toute substance présente dans le sang et les urines au moyen de la formule suivant :

$$C = \frac{U \times V}{P}$$

U = concentration urinaire de la substance en mmol/1.
P = concentration plasmatique de la substance en mmol/1.
V = débit urinaire en ml/s.

3. Exploration fonctionnelle du glomérule

Elle peut être réalisée grâce à la détermination de la clairance d'une substance excrétée par la seule filtration glomérulaire (figure 13.1), telle que l'inuline, une perfusion veineuse de la substance étudiée permettant d'obtenir une concentration plasmatique constante.

Avec l'inuline, on obtient dans ces conditions, chez le sujet normal, des valeurs de 2 **ml/s pour 1,73 m^2** de surface corporelle.

Cette clairance correspond au volume de filtrat glomérulaire ou de l'urine primitive élaboré en 1 seconde.

Les règles à respecter **pour une évaluation correcte de la** clairance sont **les** suivantes :

- *repos pendant toute l'épreuve ;*
- *recueil des urines rigoureux et suffisant ;*
- *la mesure de la clairance doit être rapportée à la surface corporelle de référence (1,73 m^2) chez l'enfant.*

3.1. Mesure de la filtration glomérulaire

Principe : si une substance filtrée à travers le glomérule n'est ni réabsorbée, ni sécrétée par le tubule, elle est intégralement retrouvée dans l'urine définitive. Sa clairance mesure le volume de l'ultra-filtrat plasmatique.

Les substances utilisées pour la mesure de la filtration glomérulaire doivent réunir les conditions suivantes :

- ne pas se fixer sur les protéines plasmatiques (non ultrafiltrables) :
- ne pas être métabolisées dans l'organisme ;
- ne pas avoir d'action pharmacodynamique ;
- être d'un dosage facile.

3.1.1. Clairance de l'inuline

L'inuline est éliminée de manière stricte par le glomérule.

La mesure de sa clairance est la méthode de référence dans l'évaluation de la filtration glomérulaire.

Cette mesure est exclusivement réservée à la recherche, où elle est très utilisée pour des mesures précises et pour apprécier la valeur de nouvelles techniques.

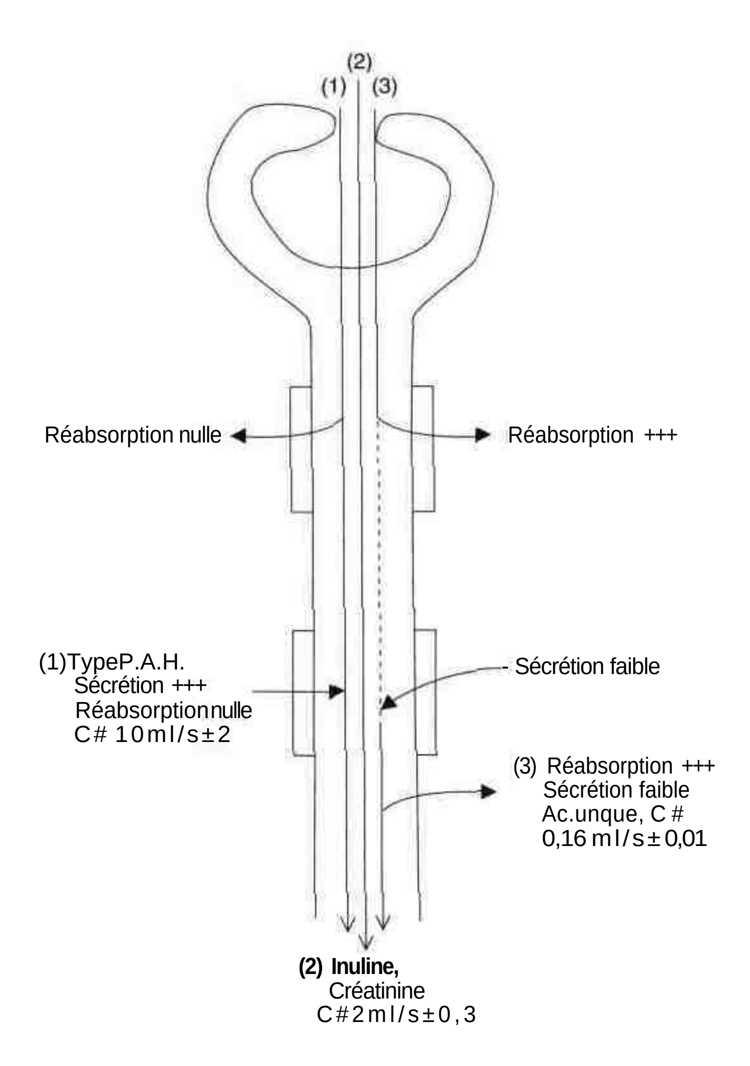


Figure 13.1 m

(1) Détermination du flux sanguin rénal par la clairance (C) du PAH. A faible concentration plasmatique, le PAH est presque totalement sécrété dans la lumière tabulaire.
(2) Mesure de la filtration glomérulaire par la clairance de la créatinine endogène. La créatinine ne présente pas de réabsorption ni de sécrétion tabulaire.
(3) L'acide urique présente une forte réabsorption et une faible sécrétion.

• *La clairance est de 2 ml/s.*

L'inuline est un polysaccharide du fructose dosé colorimétriquement par la méthode de Selivanoff car par hydrolyse préalable on obtient du fructose (coloration rouge à chaud avec du résorcinol). Elle peut être également dosée par méthode fluorimétrique ou enzymatique.

On injecte de l'inuline à 10 % en perfusion veineuse continue, la solution doit être apyrogène. On détermine la clairance sur 2 ou 3 périodes d' 1/4 heure. À la fin de chaque période on effectue :

- un recueil d'urines par sondage ;
- un lavage de vessie : avec les eaux de lavages ajoutées aux urines ;
- un échantillon de sang recueilli sur héparine.

Ce protocole lourd ne permet pas d'utiliser cette méthode en pratique clinique courante, mais cette clairance reste la méthode de référence.

3.2.2. *Clairance de la créatinine endogène*

En pratique courante, **la clairance de la créatinine est donc la seule utilisée.** La créatinine dont le taux est constant dans le plasma, est éliminée uniquement par filtration au niveau du glomérule.

Cette mesure nécessite une prise de sang et le recueil des urines avec dosage de la créatinine. La période de recueil est le plus souvent de 24 heures.

La valeur de la clairance de la créatinine est 2 ml/s ± 0,3.

Sa mesure est l'examen de base de l'exploration fonctionnelle rénale. Elle permet d'affirmer l'intégrité de la fonction rénale ou de mesurer le degré du déficit fonctionnel au cours de l'insuffisance rénale.

3.1.3. Cystatine C plasmatique

Les cystatines sont des inhibiteurs d'enzymes protéiques.

La concentration sérique en Cystatine C est fortement augmentée en cas d'insuffisance rénale grave.

En raison de son élimination exclusive par filtration glomérulaire et de sa production constante dans l'organisme, la Cystatine C a une concentration plasmatique qui dépend directement du taux de filtration glomérulaire.

Le dosage fait appel à des méthodes immunoenzymatiques, radioimmunologiques ou fluoroimmunologiques. Le coût de ces techniques limite considérablement leur utilisation.

4. Mesure du flux plasmatique rénal

L'acide para-amino-hippurique (PAH) perfusé à faible concentration est éliminé par le rein, à la fois par filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire.

A faible concentration, tout le PAH est éliminé par le rein à l'occasion d'un seul passage.

La valeur de **la clairance du PAH** devient alors **la valeur du flux plasmatique rénal** qui est de **10 ml/s (600 ml/mn),** ce qui correspond à un flux sanguin rénal de 16,6 ml/s (1 000 ml/mn), c'est-à-dire 1/5 du débit cardiaque.

Le rapport entre le taux de filtration glomérulaire et le flux plasmatique rénal définit la fraction de filtration qui normalement est égale à 20 %.

On peut également mesurer le flux sanguin rénal à l'aide de **molécules marquées par un traceur isotopique.** Les plus souvent utilisées sont celles mar-

quées à l'Iode 131 ou au Technétium 99, par des gaz radioactifs tels que le Xénon 133 et le Krypton 85, ce qui nécessite un cathétérisme artériel et reste du domaine de la recherche appliquée.

5. *Exploration fonctionnelle du tubule*

Elle consiste à étudier les deux fonctions fondamentales du tubule, réabsorption et sécrétion.

- *Réabsorption :* elle est mesurée en faisant appel à des substances dont la clairance (C) est inférieure à la clairance glomérulaire, donc C < 2 *ml/s*.

L'exemple de telles substances, réabsorbées par le tubule, est l'acide **urique :** C= 0,15-0,16 ml/s.

- *Sécrétion :* elle est mesurée en faisant appel à des substances dont la clairance est supérieure à la clairance glomérulaire.

De telles substances, sécrétées par le tubule, sont en général des substances étrangères à l'organisme, comme la phénoisulfonephtaléine (PSP), le diodrast ou le PAH, seul le TmPAH est actuellement utilisé.

5.1. Fonction de sécrétion tabulaire

5.1.1. Étude de la β_2-microglobuline

La β_2-microglobuline est une protéine de faible poids moléculaire. Son catabolisme est surtout rénal.

C'est classiquement un des marqueurs de la fonction tubulaire bien que son faible poids moléculaire entraîne une filtration glomérulaire aisée.

Son intérêt est tout de même limité car sa concentration sérique est augmentée dans de nombreuses affections extrarénales, telles que myélome, polyarthrite rhumatoïde... De plus son dosage est onéreux.

5.2. Fonction de réabsorption tubulaire

5.2.2. *Clairance de l'urée*

L'urée est éliminée par filtration glomérulaire et elle subit au niveau du tube une réabsorption partielle.

La clairance de l'urée n'est plus utilisée en pratique courante pour explorer la fonction rénale car elle est trop dépendante du débit urinaire et du régime alimentaire.

5.2.2. *Cas de la réabsorption du glucose*

Le mécanisme de reabsorption du glucose **illustre les** caractéristiques d'un système actif à capacité de transport limitée.

Normalement, pour des taux plasmatiques inférieurs à 10 mmol/1, le glucose n'est pas excrété dans les urines ; la quantité filtrée est reabsorbée. La clairance est donc nulle.

Chez un individu normal, **le glucose filtré est réabsorbé en totalité par le tube proximal.** Cette reabsorption est limitée par un taux maximal de réabsorption (Tmg) de l'ordre de 350 mg/mn (soit 32 mmol/s). Chaque individu à une valeur du Tmg constante.

Si la glycémie s'élève et devient supérieure à 10 mmol/1, il apparaît une glycosurie, la clairance devient alors positive et élevée.

En présence d'une glycosurie, il est important de savoir si la glycémie est normale ou pas.

- Si la glycémie est normale, il faut penser à un diabète rénal ou glycosurie normoglycémique qui est une affection secondaire à un abaissement du seuil de réabsorption rénal du glucose. Mais seule l'hyperglycémie provoquée permet d'éliminer un diabète sucré.
- Si la glycémie est supérieure à 10 mmol/1, il y a tout lieu de penser à un diabète sucré.

5.3. Fonction de concentration - dilution

L'osmolalité plasmatique est fixe, voisine de 300 mOsm/kg. L'osmolalité des urines est variable de 50 à 1 200 mOsm/kg. Elle est fonction de la boisson et de l'alimentation, généralement comprise entre 500 et 800 mOsm/kg (cf. chapitre 1).

5.3.7. *Pouvoir de dilution, épreuve de charge hydrique*

Le sujet en état d'hydratation normale ingère en 30 à 60 minutes, une charge aqueuse de 20 ml/kg. Les urines sont recueillies toutes les heures pendant 5 heures. L'osmolalité d'un des échantillons doit être voisine de 100 mOsm/kg. Normalement 50 % de la charge aqueuse sont éliminés en 2 heures et 80 % en 5 heures.

5.3.2. Pouvoir de concentration, restriction hydrique

Le sujet qui reçoit un régime riche en protéines et en sel, pauvre en boisson, est soumis à un jeûne hydrique complet de 20 h à 8 h le lendemain. La vessie est vidée à 24 h. L'osmolalité de 8 h du matin doit être normalement supérieure à 800 mOsm/kg.

5.3.3. *Eau libre*

L'eau libre est la quantité d'eau qui devrait être « ajoutée» (en cas d'urines concentrées) ou « retranchée » (en cas d'urines diluées) à l'urine pour obtenir une urine iso-osmolaire.

5.3.4. *Clairance osmolaire*

La clairance osmolaire est égale au volume du plasma en ml épuré par le rein de ses substances osmotiquement actives, par seconde.

Elle est fournie par la formule générale :

$$\text{C osmol.} = \frac{\text{U osmol.} \times \text{V}}{\text{P osmol.}}$$

C osmol. **:** *clairance osmolaire.*
U osmol. **:** *osmolalité urinaire.*
P osmol. : osmolalité sanguine.
V : débit urinaire en ml/s.

Si la charge osmolaire est éliminée de façon isotomique au plasma :

U osmol. = P osmol.

5.3.5. *Clairance de l'eau libre*

La clairance de l'eau libre (C_H o) est la différence entre le débit urinaire V et la clairance osmolaire C osmol (cf. chapitre 1).

$$\mathbf{C_{H\ O} = V - C\ osmol.}$$

Si C_H o est négative, on dit que les urines sont concentrées ; c'est le cas normal. La réabsorption de l'eau libre est augmentée sous l'effet de la sécrétion accrue de l'hormone antidiuretique.

Si C_{H_2O} est positive, les urines sont diluées. La réabsorption de l'eau libre est diminuée sous l'effet d'une sécrétion insuffisante d'hormone antidiurétique.

d. *Physiopathologie des variations de la diurèse*

La diurèse est sous la dépendance d'un mécanisme neurohypophysaire qui intervient par le mécanisme de la soif, de la sécrétion de l'hormone antidiurétique et d'un mécanisme rénal. La réabsorption de l'eau et des osmoles dépend de la quantité filtrée et des effets sur la fonction tubulaire de facteurs hémodynamiques et hormonaux.

À partir de l'ultra-filtrat, le rein va pouvoir émettre une urine concentrée ou diluée par rapport au plasma dont l'osmolalité est constante et de 300 mOsmol/kg. Les urines peuvent aller jusqu'à 1 200 mOsmol/kg ou diluées avec des valeurs pouvant atteindre 50 mOsmol/kg.

6.1. Pouvoir de concentration

II est altéré de manière précoce au cours de l'évolution de toute insuffisance rénale chronique. Les néphrons fonctionnels restants assurent l'excrétion de la charge aqueuse et de la charge osmotique. La charge osmotique accrue par néphron induit une polyurie osmotique par néphron résiduel. Une charge osmotique identique administrée à un sujet sain et à un sujet insuffisant rénal sera éliminée avec un volume d'urines plus élevé chez l'insuffisant rénal que chez le sujet sain. Le volume d'eau requis, pour l'élimination de la charge osmotique, sera d'autant plus élevé que la fonction rénale sera réduite.

6.2. Pouvoir de dilution

II est touché plus tardivement. Dans ce cas, sous l'effet de la charge osmotique par néphron, le mécanisme de dilution fonctionne mal.

7. *Lithiases*

La lithiase rénale est une affection fréquente. Le traitement des calculs par lithotriptie, c'est-à-dire par onde de choc, permet d'éviter souvent la chirurgie et rend les récidives moins fréquentes.

7.1. Lithiases calciques

Lors d'une lithiase calcique, il est nécessaire de pratiquer les analyses suivantes : calcium sanguin, calcium urinaire, acide urique des 24 heures.

On retrouve des lithiases calciques dans plusieurs éventualités :

- *lors d'une hypercalcémie :* c'est souvent le cas d'un **hyperparathyroïdisme primaire ;**
- *lors d'une hypercalciurie sans hypercalcémie :* c'est le cas **d'une acidose tubulaire rénale distale, d'une hypercalciurie idiopathique, d'une hypercalciurie d'absorption** (ce dernier cas étant le plus fréquent) ;
- *lors d'une hyperuricurie :* les cristaux d'urate de calcium pourraient entraîner la nucléation hétérogène de l'oxalate de calcium ;

- *lors d'une hyperoxalurie :* il faut toujours penser à une hyperoxalurie quand la lithiase d'oxalate de calcium apparaît avant 20 ans. Il existe une **hyperoxalurie primitive** transmise selon un mode autosomique récessif et une **hyperoxalurie d'origine intestinale** (maladie de Crohn, résection intestinale).

7.2. Lithiase de phosphates ammoniaco-magnésiens

Les calculs de phosphates ammoniaco-magnésiens se forment habituellement dans le rein ou la vessie.

Ils sont souvent d'origine infectieuse.

7.3. Lithiase urique

L'acide urique est librement filtre par le glomérule et presque totalement réabsorbé dans la partie initiale du tube contourné proximal. L'acide urique excrété provient surtout d'une sécrétion par le tube proximal.

L'hyperuricurie peut provenir de l'augmentation de l'apport alimentaire et du catabolisme tissulaire, de l'élévation de la sécrétion tubulaire ou d'une diminution de la réabsorption (cf. chapitre 11).

Il peut y avoir :

- *des lithiases d'acide urique sans hyperuricurie :* c'est le cas de la réduction du volume urinaire et la diminution du pH urinaire. Pour diminuer le risque, on doit proposer au malade d'abondantes boissons alcalines ;
- *des lithiases d'acide urique avec hyperuricurie :* on les retrouve dans la goutte primitive, dans les états hypercataboliques, la glycogénose de type 1 ;
- *des lithiases d'acide urique sans hyperuricémie avec hyperuricurie :* c'est le cas des régimes riches en purines.

7.4. Lithiase cystinique

Cette lithiase se manifeste dans l'adolescence. Elle est héréditaire selon un mode autosomique récessif.

8. Exploration du système rénine angiotensine, au cours de l'hypertension artérielle

Le rein intervient dans le contrôle de la pression artérielle grâce au système rénine angiotensine qui libère la rénine, capable d'hydrolyser l'angiotensinogène et de libérer l'angiotensine 1 qui sera transformée en angiotensine II grâce

à l'enzyme de conversion. L'angiotensine stimule la sécrétion" d'aldostérone, ainsi que le système neuroadrénergique.

8.1. Méthodologie

8.1.1. Activité rénine plasmatique (ARP)

Elle est explorée par des techniques radio-immunologiques en mesurant la quantité d'angiotensine II formée en excès de substrat par l'action de la rénine.

Dans les conditions de base, régime normosodé, repos depuis 12 heures, l'ARP est comprise entre **7,5** *et 2* ***ng/ml/h.***

8.1.2. Aldostérone sanguine et urinaire

Ces dosages sont utiles au cours des épreuves dynamiques. Ils sont effectués par méthode radio-isotopique.

8.2. Intérêt clinique

8.2.1. Hyperaldostéronisme primaire

Au cours de l'hyperaldostéronisme primaire, il existe une augmentation du taux d'aldostérone plasmatique et urinaire et une activité rénine angiotensine basse et non stimulable.

8.2.2. Sténose de l'artère rénale

Une sténose importante de l'artère rénale entraîne, dans la majorité des cas, une élévation de l'ARP périphérique.

La mesure de l'ARP dans les deux veines rénales représente un argument important dans la décision thérapeutique : un gradient supérieur à 1,5 laisse prévoir une guérison de l'HTA dans les 2/3 des cas après traitement chirurgical de la sténose.

Conclusion

Pour que l'exploration fonctionnelle rénale soit interprétable il faut qu'elle ait été effectuée avec rigueur (recueil des urines).

Les méthodes d'exploration nécessitent souvent un **sondage** vésical ou un cathétérisme urétéral d'où **risque d'infection.** Elles sont pourtant indispensables.

L'exploration fonctionnelle rénale fait appel à de nombreux examens de routine ou spécialisés qu'il faut choisir en fonction de chaque cas clinique.

Ces résultats doivent être confrontés à ceux fournis par les diverses techniques d'imagerie :

- **l'urographie intraveineuse** qui utilise des produits de contraste iodés, injectés par voie intraveineuse puis éliminés par voie urinaire ;
- **l'urétéropyélographie rétrograde ;**
- **l'angiographie rénale** qui permet d'opacifier le système artériel ;
- **l'échograhie ;**
- **la scintigraphie ;**
- **la tomographie informatisée (scanner) et la résonance magnétique nucléaire enfin.**

Dès qu'un problème d'équilibre hémodynamique, phosphocalcique, acido-basique ou un trouble du métabolisme de l'eau se présente il est souhaitable de faire appel à un service d'exploration fonctionnelle rénale qui sera le plus apte à répondre à l'attente du malade et de son médecin traitant.

Références bibliographiques

P. Barjon, *Néphrologie,* Ellipses, Paris, 1991.

M. Legrain, J.M. Suc, *Abrégé de Néphrologie,* Masson, 3e éd., Paris, 1985.

R.F. Pitts, *Physiologie du rein et* ***du milieu*** *intérieur,* Masson, Paris, 1973.

M. Polonovski, *Biochimie médicale, fascicule III, 8e* éd., Masson, Paris, 1968.

La vie médicale. ***Les*** *nouvelles questions : Néphro-urologie 1,* octobre 1/1988.

0. Tenstad, A.B. Roald, A. Grubb et K. Aukland. Rénal handiing of radiolabelled human cystatin C in thé rat. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.,* 1996, 56 : 409-411.

14

Éléments d'organisation du laboratoire

Pierre Valdiguié
Jacques De Graeve

1. Introduction

L'examen biologique n'est pas seulement une analyse, mais représente un **ensemble complexe d'étapes qui, du prélèvement au compte rendu final,** nécessite une surveillance permanente. Les résultats devront en effet être aussi exacts que les techniques modernes le permettent.

Cette « production » de résultats est issue de trois étapes successives :

La première, **préanalytique,** s'effectue d'abord au contact du patient et correspond au prélèvement ; elle se continue par le transport et la réception du prélèvement par le laboratoire.

La deuxième, **analytique,** est l'étape technique proprement dite avec tous les éléments du traitement de l'échantillon.

La troisième étape, **post-analytique,** consiste à valider les résultats bruts, à les analyser dans leur cohérence et à les présenter dans une forme permettant une bonne interprétation par le prescripteur.

Chaque étape de ce processus analytique est l'objet de contrôles qui contribuent à une **assurance de qualité.**

2. Prélèvement

La procédure de recueil du prélèvement devra tenir compte de trois types de paramètres (tableau 14.1).

Tableau 14.1 • Facteurs de variabilité des prélèvements.

Sujet	— *état physiologique*	• âge, sexe, taille, poids • jeûne, stress, activité physique, régime, tabac • grossesse, lactation, ménopause	
	- *position*	• debout • couchée	
	- *rythmes*	• circadien • hebdomadaire • mensuel	
Constituant	- *métabolisme in vitro, dégradation*		
	— *sensibilité aux agents extérieurs*		• lumière • variations de température
	- *effecteurs*	• analogues structuraux • médicaments	
Spécimen	- *plasma/sérum*		
	- *urines*		
	— *liquide céphalorachidien*		
	— *ponction veineuse / artérielle*		
	— *ponction avec ou sans garrot*		

2.1. Paramètres liés au sujet

Si un **jeûne de 12 heures** est impératif pour un bilan lipidique, la glycémie et la phosphatémie, un jeûne de 3 heures est suffisant pour la majorité des autres paramètres.

2.2. Paramètres liés au constituant dosé

II faut éviter une dégradation du constituant à doser soit en utilisant un agent conservateur, soit en respectant la chaîne du froid.

Un point particulier doit être noté pour les prélèvement sanguins : **l'hémolyse.** Généralement l'hémolyse est liée à un mauvais prélèvement, elle pose des problèmes pour la majorité des analyses (tableau 14.2)

2.3. Paramètres liés au spécimen

Ils varient avec la nature du spécimen et du lieu de ponction (tableau 14.3).

Tableau 14.2 • Rapports des concentrations de quelques constituants de *l'érythrocyte* par rapport au sérum.

Créatinine	1,60
Potassium	25
Magnésium	2,7
LDH	160
Phosphatases acides	**57**
TGO	**3**
TGP	20

Tableau 14.3 • Exemples d'utilisation des tubes en biochimie (les couleurs sont celles de la société « Becton Dickinson ».

Tube héparine (bouchon vert)	lonogramme. Ammonium, Cortisol
Tube fluoré (bouchon gris)	Glucose, Lactate
Tube sec avec gel séparateur (bouchon rouge marbré)	Enzymes, Médicaments, lonogramme. Substrats
Tube EDTA (bouchon violet)	Hémoglobine glyquée. Bilan lipidique

Dans tous les cas, si le prélèvement n'est pas effectué par le laboratoire, il est conseillé de noter le maximum d'information, concernant les paramètres précédents, sur le bon de demande et de l'identifier soigneusement (ces erreurs étant malheureusement les plus courantes et les plus difficiles à rectifier).

Paradoxalement le prélèvement le plus difficile à pratiquer, même en dehors du cas du nourrisson, est celui des urines (tableau 14.4).

Pour une réalisation correcte des analyses sur un échantillon urinaire de 24 heures, il est fondamental qu'un recueil complet et précis des urines soit effectué.

Tableau 14.4 • Procédure de recueil des « urines de 24 heures »

1. Vider la vessie le matin au lever.
2. **Jeter** ces **urines** et noter la date et l'heure.
3. À partir de ce moment-là, dans un récipient propre fourni par le laboratoire, **collecter les urines de chaque miction, tout au long** de la journée.
4. Faites le **dernier recueil, le jour suivant, au lever,** à la même heure que la veille.
5. Apporter le récipient au laboratoire le plus vite possible.

Globalement une analyse sanguine nécessite 50 à 200 |JLI d'échantillon, il suffit donc de recueillir autant de fois ce volume que de paramètres à doser plus 1 ml pour tenir compte des contrôles et des volumes morts avant centrifugation. La durée de conservation doit être réduite au maximum. Après décantation, les temps de conservation sont variables en fonction de la durée et de la température de conservation (tableau 14.5).

Tableau 14.5 • Principales durées de conservation (selon les recommandations de la SFBC).

CONSERVATION DES SUBSTRATS (Sériques et/ou plasmatiques)			
Substrat	+4°C	20-25 °C	-20°C
Bilirubine *	oui	oui	oui ±
Cholestérol	< 6 jours	< 6 jours	au moins 6 mois
Créatinine	24 h	24 h	au moins 6 mois
Fer	< 7 jours	< 4 jours	?
Albumine	< 6 jours	< 6 jours	au moins 6 mois
Glucose	< 7 jours	<24h	+
Urates	5 jours	5 jours	au moins 6 mois
Urée	< 3 jours	<24h	au moins 6 mois
Triglycérides	< 3 jours	non	–
Phosphates	< 7 jours	< 2 jours	–
* A la condition que le tube soit toujours conservé à l'abri de la lumière.			

CONSERVATION DES ENZYMES (en tube fermé) Délai pendant lequel la perte d'activité des enzymes est < à 10 %			
Enzymes	+4°C	20-25 °C	-20°C
Aldolase	< 5 jours	< 3 jours	–
a-amylase	< 5 jours	< 5 jours	–
Cholinestérase	< 7 jours	< 7 jours	1 semaine
CK (NAC activée)	< 7 jours	< 2 jours	1 mois
CK-MB (NAC)	<24h	<1h	–
TGO (ASAT)	< 3 jours	< 3 jours	1 mois
TGP (ALAT)	< 3 jours	< 3 jours	non, instable
γGT	7 jours	7 jours	1 mois
LDH	3 jours	3 jours	instable
Lipase	5 jours	24 h	–
Phosphatases alcalines	< 7 jours	< 2-3 jours	1 mois

3. *Traitement du prélèvement **

Pour chaque analyse, il existe une procédure analytique bien définie, associant les éléments suivants, réunis dans un manuel interne au laboratoire :

1) *Logistique :* localisation, nom du responsable (numéro de téléphone, de télécopie), disponibilité, délai de réponse, possibilité de réponse en urgence, cotation.

2) *Spécimen :* nature, volume, type de tube, identification, étiquetage, prétraitement éventuel du prélèvement, conditions de stabilité, conditions de transport en cas de sous-traitance.

* *Reproduit avec l'aimable autorisation de A. Vassault(2).*

3) *Facteurs de variations biologiques* (à prendre en compte pour le prélèvement), renseignements cliniques indispensables.

4) *Principe de dosage.*

5) *Matériels - méthodes :* appareil, réactifs (qualité, contrôles, stabilité), étalons primaires (nature, nombre, stabilité), spécimens de contrôle (nature, nombre, mode d'utilisation, stabilité...), calibrateurs (nombre, nature, précautions...).

6) *Mode opératoire :* préparation des spécimens, des réactifs, des calibrateurs, conditions opératoires du dosage (programmation des instruments, température, rapport de dilution, durée et nombre de mesures, nature du blanc réactif, mode, fréquence et contrôle du calibrage...), calculs (mode d'expression, conversions du système SI versus système conventionnel).

7) *Contrôle :* valeurs cibles, limites d'acceptabilité en fonction du type de spécimen de contrôle, limites de rejet, limites d'alerte.

8) *Performances analytiques :* domaine de mesure (limite de détection, limites de linéarité), précision pour différents niveaux de concentration (dans la série, de série à série), exactitude, interférences (endogènes : bilirubine, trouble, hémolyse-exogènes : médicaments).

9) *Valeurs usuelles :* en fonction de l'âge, du sexe, des conditions physiologiques.

10) *Précautions - causes d'erreur :* nature du liquide de dilution pour les réanalyses, limites de stabilité de l'analyse, procédures à suivre pour les spécimens hémolyses, troubles ou ictériques, précautions pour acheminer les spécimens adressés à d'autres laboratoires.

11) *Valeur séméiologique et interprétation :* application au diagnostic ou à **la** surveillance des maladies, limites et informations utiles.

12) *Références bibliographiques.*

13) *Remarques éventuelles :* technique de dépannage en cas d'indisponibilité d'appareil ou de reactif.

14) *Cahier de bord :* changement de lot de calibrateur, changements de lot de réactifs.

15) *Sérothèque.*

4. Résultat — Interprétation

4.1. Erreurs analytiques

Elles sont de deux types.

4.1.1. Erreurs aléatoires

Elles affectent la PRECISION du processus analytique.

La précision est : l'accord, la similitude entre des mesures répétées sur un même échantillon.

L'imprécision caractérise **la dispersion des valeurs obtenues lors des mesures répétées de ce même échantillon.** L'imprécision peut être quantifiée par l'ÉCART-TYPE ou par le COEFFICIENT de VARIATION.

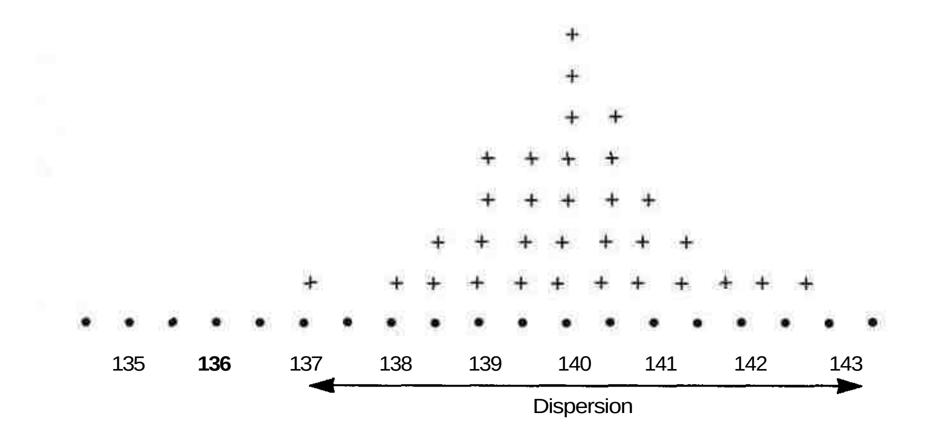


Figure 14.1 • Schéma d'une distribution montrant l'imprécision des résultats (ion Sodium).

Lorsque l'imprécision est calculée sur des mesures répétées dans les mêmes conditions (même série, sans réétalonnage), on utilise le terme de RÉPÉTABILITÉ. Le terme de REPRODUCTIBILITÉ correspond à des mesures répétées dans des conditions différentes (jour à jour, laboratoire à laboratoire, technicien à technicien...).

Les erreurs aléatoires affectent tous les échantillons en plus ou en moins, avec une amplitude variable d'un échantillon à l'autre. On peut distinguer :

- *les erreurs aléatoires relatives :* l'amplitude maximale de l'erreur est fonction de l'analyse.

Exemples :

- incertitude sur la mesure des volumes de l'échantillon ou du réactif ;
- instabilité du système photométrique ;
- instabilité du système de thermostatisation...

- *les erreurs aléatoires « constantes » :* l'amplitude maximale de l'erreur est constante quelle que soit l'analyse.

Exemple : incertitude sur la détermination du point d'équivalence lors de mesures titrimétriques.

4.1.2. Erreurs systématiques

Elles affectent l'EXACTITUDE du processus analytique.

L'exactitude est **l'accord entre la meilleure valeur estimée de la quantité mesurée et la valeur vraie.**

- La meilleure valeur estimée peut être la moyenne des résultats de mesures repétées.
- La valeur vraie est la valeur obtenue avec une technique de référence.

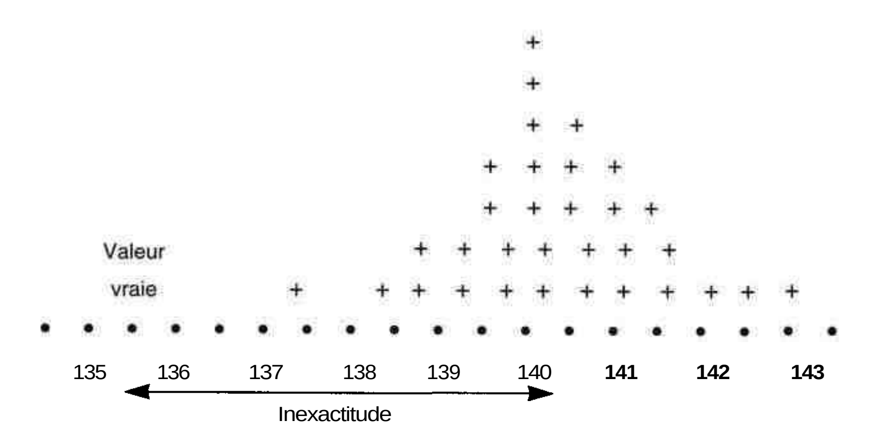


Figure 14.2 • Exemple d'une distribution révélant une erreur d'exactitude (ion Sodium).

En présence d'erreurs systématiques, tous les résultats sont affectés d'un biais dans le même sens. On peut aussi, pour ce type d'erreur, différencier :

- *les erreurs systématiques relatives :* le biais est fonction de l'analyse effectuée et dépend de diverses variables. Exemples :
- erreur sur la concentration de l'étalon ;
- erreur sur les mesures de volume (réactif ou échantillon) pour les techniques utilisant un coefficient et non un étalon :
- décalage de la longueur d'onde du spectrophotomètre ou thermostatisation inexacte pour les mesures d'activités enzymatiques.
- Récupération imparfaite lors d'extraction :
- *les erreurs systématiques « constantes » :* **le** biais est indépendant de l'analyse en cause. Exemples :
- existence d'un trouble non compensé par la soustraction d'un blanc sérum ou d'un blanc réactif ;
- évolution du blanc reactif lors de mesures d'activité enzymatique.

Ces erreurs s'ajoutent et contribuent à une erreur totale, cette somme pouvant être favorable (erreurs qui se compensent) ou défavorables (erreurs qui se cumulent). Ces erreurs doivent rester dans des limites d'acceptabilité spécifiques

(tableau 14.6). Les critères retenus par la Société française de biologie clinique (SFBC) sont maintenant acceptés par la plupart des laboratoires.

Tableau 14.6 • Critères de performance acceptable.

TEST	SFBC
Enzymes	
Alanine aminotransférase	20%
Amylase	20%
Aspartate aminotransférase	20%
Créatine kinase (CK)	20%
Lactate déshydrogénase (LDH)	20%
Phosphatase alcaline	20%
Substrats	
Acide urique	12%
Albumine	10%
Bilirubine totale	15%
Calcium	4,6%
Cholestérol	16%
Créatinine	15%
Glucose	10%
Fer	10%
Protéines totales	15%
Triglycérides	14%
Urée	12%
Electrolytes	
Chlorures	4%
Magnésium	10%
Potassium	6,8%
Sodium	3%

4.2 Mode d'expression des résultats

Une très grande rigueur doit être utilisée pour exprimer ces résultats. La valeur numérique doit comporter au maximum deux chiffres après la virgule. Les unités et leurs sous-multiples résultent de cette règle. De même, un résultat ne doit pas comporter plus de trois chiffres, dans le cas contraire le multiple supérieur de l'unité doit être utilisé. Les éléments nécessaires pour décrire la valeur d'un constituant biologique d'un sujet à l'aide d'une quantité sont repris dans les tableaux 14.7 et 14.8.

Tableau 14.7 • Éléments nécessaires pour décrire une valeur biologique.

Élément de la description	**Exemple**
Système (dont est issu le constituant)	Sérum du patient X à un moment donné
Constituant	Ion sodium
Type de quantité	Concentration de substance
Valeur numérique	141
Unité	Millimoles par litre

Tableau 14.8 • Exemple pratique de compte rendu, tenant compte des recommandations internationales.

Systèmes *	Constituant	Type de quantité **	Valeur numérique	Unit*	Intervalle de référence
S	Albumine	masc.	42,3	g/1	41,3 ± 4,0
		substc.	613	µmol/l	600 ± 58
(JPt)S	Bilirubine	substc.	48	u.mol/1	12 ± 6
S	Calcium	substc.	2,5	mmol/1	2,5 ± 0,25
S	Urée	substc.	4.2	mmol/1	4,2 ± 2,3
dU	Urée	qs.	142	mmol/1	260 ± 80
S	Cholestérol	substc.	6.2	mmol/1	5,6 ± 0,9
S	Créatinine	substc.	73	iimol/1	80 ±40
(JPt)S	Fer	substc.	23,6	u.mol/1	21,5 ± 5,5
(jPt)S	Glucose	substc	5,6	mmol/1	5,0 ± 0,5
Sg	Hémoglobine	substc.	9,6	mmoVl	9,1 ± 1,2
S	Protéines	masc.	71	g/1	68,7 ± 2,4
S	Phosphatases alcalines	catc.	1,73	uKat/1	0,5 ± ,025
(JPt)S	Urate	substc.	0,28	mmol/1	0,33 ± 0,10
dU	Urate	qs.	2,42	mmol/1	2,40 ± 0,8

* **Système :** *dU :* Urine de 24 h, *j :* à jeun, *P :* plasma, *Pt :* patient, *S :* Sérum, *Sg :* Sang.
** Types **de quantité :** *masc. :* concentration de masse, *substc. :* concentration de substance (« concentration molaire »), *qs. :* quantité de substance, *qs. rel. :* quantité de substance relative, *catc. :* concentration catalytique (concentration d'enzyme).

Tous les éléments doivent contribuer à une interprétation correcte des résultats. Cependant, dans tous les cas, un bon dialogue entre le prescripteur et le biologiste permettra de supprimer les éventuelles anomalies résiduelles et d'optimiser l'interprétation et les éventuelles prescriptions complémentaires.

5. *Assurance de qualité*

En principe, le contrôle de qualité repose sur **un contrôle national obligatoire** instauré par la loi de juillet 1975 (art. L.761.14 du code de la santé publique), pour lequel est prélevée une taxe équivalence à 1 140 fois la valeur de la lettre-clé B (1,70 F).

Ce contrôle est actuellement organisé en biochimie par l'AFSSAPS (Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé) (Ministère de la Santé).

Le contrôle est ponctuel ; il comporte plusieurs envois annuels de 2 échantillons lyophilisés (généralement un à taux « élevés » et un à taux « bas » (tableau 14.9) sur chacun desquels est déterminé un nombre limité de paramètres (environ 8).

Tableau 14.9 • Règles de reconstitution des échantillons de contrôle.

La reconstitution des sérums de contrôle lyophilisés doit être conduite avec un soin particulier par un responsable particulier du laboratoire. Il faut évidemment :
- éviter les pertes à l'ouverture du flacon ;
- utiliser pour la reconstitution de l'eau très pure ;
- utiliser des pipettes de précision à deux traits ;
- mélanger par retournements lents puis laisser reposer jusqu'à dissolution complète (environ une demi-heure), puis homogénéiser par agitation douée sans faire apparaître de mousse.

Sous couvert d'un numéro d'anonymat, ces résultats sont retournés à l'organisme centralisateur qui en fait le **traitement statistique** ; celui-ci est renvoyé sous forme de bordereaux individuels et à plus long terme sous forme de compte rendu détaillé en fonction des codages des techniques et des automates (tableau 14.10).

Ce contrôle ne porte que sur les paramètres les plus usuels et seulement une fois par an pour chacun d'entre eux.

C'est pourquoi ce contrôle doit être renforcé par d'autres contrôles : échantillons titrés du commerce mais aussi **échanges inter-laboratoires organisés par des associations régionales habilitées** à cet effet.

Ainsi par exemple, le ***centre toulousain pour le contrôle de qualité en biologie clinique*** (CTCB) organise un contrôle plus étoffé puisqu'il comprend :

- *un contrôle de reproductibilité* sur un échantillon lyophilisé du commerce analysé tous les jours sur tous les paramètres, ceci permettant d'évaluer le **CV** % de chaque paramètre pour le laboratoire et de le confronter à celui obtenu par les autres laboratoires effectuant ce même contrôle (tableau 14.11).

- *un contrôle «en aveugle» hebdomadaire* (tableau 14.12 et figure 14.3) dont les résultats peuvent être interprétés de façon quasi immédiate à l'aide d'un serveur Internet.

Tableau 14.10 ■ Exemple de compte rendu du contrôle de qualité national (publié avec l'aimable autorisation de A. LEBLANC. LNS)

MINISTÈRE DE LA SANTÉ
CONTRÔLE DE QUALITÉ NATIONAL
AFSSAPS

LABORATOIRE :

MOIS : 1299

PARIS : LE 10.04.00

								Toutes techniques			Par technique(s) ou appareils			
COMPOSANT	**SER.**	**U.**	**TEC**	**APP**	**ETA.**	**RÉSULTAT**		**MOY. GÉNÉ.**		**100 R/M**	**CODE**	**MOYENNE**		**100 R/M**
Ac. Urique	AF	F	3K	FK	9K	140.000	(23.53) *	140.50	(23.61)	99.64 %	3K	132.78	(23.72)	105.44 %
Ac. Urique	AJ	F	3K	FK	9K	664.00	(111.60)	606.28	(101.90)	109.52 %	3K	637.40	(107.13)	104.17 %
						RÉSULTATS ACCEPTABLES					BONS RÉSULTATS			
Amylase	AF	Z	3K	FK	9K	40.00					3K	36.65		
Amylase	AJ	Z	3K	FK	9K	198.00					3K	204.23		
											BONS RÉSULTATS			
Bilirubine	AF	F	3K	FK	4L	50.00	(29.24)	51.32	(30.01)	97.43 %	3K	52.49	(30.69)	95.27 %
Bilirubine	AJ	F	3K	FK	4L	119.00	(69.59)	134.98	(78.93)	88.16 %	3K	123.43	(72.18)	96.41 %
						RÉSULTATS ACCEPTABLES					BONS RÉSULTATS			
Calcium	AF	E	3K	FK	9K	2.22	(88.80)	2.34	(93.48)	95.00 %	3K	2.23	(89.37)	99.37 %
Calcium	AJ	E	3K	FK	9K	2.91	(116.40)	3.15	(126.11)	92.30 %	3K	2.91	(116.59)	99.84 %
						FACTEURS D'EXACTITUDE À CONTRÔLER					BONS RÉSULTATS			
Créatinine	AF	F	3K	FK	9K	355.00	(40.16	326.30	(36.91)	108.80 %	3K	344.71	(38.99)	102.98 %
Créatinine	AJ	F	3K	FK	9K	167.00	(18.89)	152.72	(17.28)	109.35 %	3K	165.29	(18.70)	101.03 %
						BONS RÉSULTATS					BONS RÉSULTATS			
L.D.H.	AF	Z	3K	FK	9K	2205.00		SFBC UI/L 30 : 1426.0		154.63 %	3K	2184.26		100.95 %
L.D.H.	AJ	Z	3K	FK	9K	2026.00		SFBC Ui/L 30 : 1133.0		178.82 %	3K	2038.45		99.39 %
											BONS RÉSULTATS			
Phosphate	AF	E	4K	FK	9K	1.60	(50.00)	1.58	(49.37)	101.28 %	4K	1.58	(49.38)	101.25 %
Phosphate	AJ	E	4K	FK	9K	3.00	(93.75)	3.26	(101.92)	91.99 %	4K	3.04	(94.87	93.82 %
						BONS RÉSULTATS					BONS RÉSULTATS			
Protéines	AF	A	3K	FK	9K	71.00		74.53		95.26 %	3K	71.09		99.87 %
Protéines	AJ	A	3K	FK	9K	51.00		53.65		95.07 %	3K	52.46		97.23 %
						BONS RÉSULTATS					BONS RÉSULTATS			

LE RESPONSABLE SCIENTIFIQUE

* Les résultats entre parenthèses sont donnés en mg/l.

Tableau 14.11 ■ Exemple de compte rendu du contrôle quotidien de reproductibilité.

CONTRÔLE QUOTIDIEN DE REPRODUCTIBILITÉ

Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique

Octobre 99 — Contrôle n° 10 — Laboratoire n°

RÉSULTATS TRAITÉS LE 16/11/99

	RÉSULTATS DE TOUS LES LABOS					VOS RÉSULTATS			RÉSULTATS DE VOTRE TECHNIQUE				
	Nombre	**Effectif mesures**	**Moyenne**	**Écart type**	**Tech.**	**Effectif**	**Moyenne**	**Écart type**	**Pos.**	**Nombre labos**	**Effectif mesures**	**Moyenne**	**Écart type**
ACIDE URIQUE	54	1055	312.406	16.18	3K	22	302.636	2.68	B–	6	113	303.771	7.59
ALBUMINE		18	37.928	1.65									
AMYLASE					3K	22	94.091	2.29		4	80	93.688	2.55
BICARBONATES	48	928	16.778	1.94	YO	22	19.632	0.86	C+	6	115	19.150	1.19
BILIRUBINE	49	852	35.067	2.35	3K	22	35.536	1.00	A+	6	99	34.861	1.85
CALCIUM	54	996	2.749	0.09	3K	22	2.677	0.02	B–	6	114	2.684	0.05
CHLORURE	50	980	100.055	3.31	PK	22	103.364	0.73	C+	6	114	104.295	2.05
CHOLESTÉROL	54	1070	4.256	0.19	3K	22	4.154	0.07	B–	6	116	4.331	0.14
C.K.	8	152	196.217	21.98	3K	22	178.955	6.86		5	88	190.841	16.30
CRÉATININE	55	1092	153.753	9.76	3K	22	156.409	3.54	A+	6	115	156.161	5.02
FER	49	869	27.848	1.83	RR	22	29.182	0.72	B+	11	152	28.005	1.39
FER CAPACITÉ	2	34	121.721	27.67	XX	22	102.227	7.25					
GLUCOSE	55	1066	5.397	0.28	3K	22	5.350	0.07	A–	6	115	5.556	0.14
GAMMA G.T.	13	296	123.506	33.36	3K	21	163.571	4.90		6	114	161.184	6.90
L.D.H.	7	137	1847.628	509.68	3K	22	2206.500	40.38		5	86	2169.942	50.62
LITHIUM	14	107	1.173	0.05									
MAGNÉSIUM	50	905	1.086	0.007	EA	22	1.122	0.04	B+	19	375	1.100	0.07
PHOSPH.ALC.	13	255	101.435	5.80	3K	22	105.909	2.43		6	114	103.623	6.14

Tableau 14.12 ■ Exemple de compte-rendu de contrôle hebdomadaire « en aveugle ».

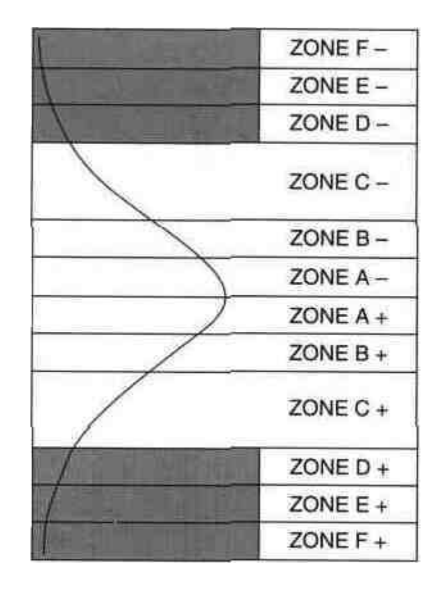
CONTRÔLE HEBDOMADAIRE D'EXACTITUDE

Centre Toulousain pour le Contrôle de qualité en Biologie clinique

Contrôle n° du 4 octobre 99

	Votre résultat	RÉSULTATS DE TOUS LES LABOS				RÉSULTATS POUR VOTRE TECHNIQUE				
		Effectif	Moyenne	Écart type	Pos.	Code	Effectif	Moyenne	Écart type	Pos.
ACIDE URIQUE	238.000	132	249.795	11.786	C–*	3	27	242.968	5.785	B–
CALCIUM	1.760	129	1.725	0.069	A+	3	27	1.783	0.046	B–
CHLORURE	81.000	126	83.700	2.669	C–	3	27	81.521	1.190	A–
CHOLESTÉROL	3.100	129	3.343	0.130	C–	3	25	3.237	0.095	C–
GLUCOSE	3.790	134	3.838	0.174	A–	3	28	3.860	0.129	B–
PHOSPHATE	1.290	121	1.209	0.062	C+	3	25	1.188	0.053	C+
POTASSIUM	3.930	133	4.003	0.090	B–	3	27	3.974	0.112	A–
PROTÉINES	56.000	131	53.112	2.143	C+	3	27	53.685	1.530	C+
SODIUM	108.000	134	111.803	2.623	C–	3	27	108.981	1.697	B–
TRIGLYCÉRIDES	1.710	134	1.465	0.138	C+	3	25	1.622	0.075	C+
URÉE	8.100	138	8.000	0.427	A+	3	27	8.199	0.258	A–
BICARBONATES	17.000	112	17.089	1.210	A–	3	26	16.513	1.606	A+
BILIRUBINE	19.000	122	21.758	1.932	C–	3	29	21.203	1.817	C–
FER		113	17.331	1.118		3	17	17.471	1.490	
MAGNÉSIUM		118	0.686	0.048		3	21	0.646	0.039	
CRÉATININE	118.000	132	129.553	8.157	C–	3	27	122.132	4.609	B–

* Les lettres correspondent aux limites obtenues à partir de la distribution des résultats (cf figure 14.3)



M = MOYENNE GÉNÉRALE

ZONE A M±0,5xs
ZONEB M±s
ZONE C M ± 2 x s

S = ÉCART TYPE

ZONED M ±2,5 X s
ZONEE M ±3 x s
ZONE F+ > M +3 X s
ZONE F- < M-3 X s

Les *zones A, B, C correspondent aux limites de l'intervalle de fluctuation à 95% et donc à une exactitude correcte.*

Figure 14.3 • Exemple de compte rendu hebdomadaire du contrôle d'exactitude du CTCB avec ses critères d'interprétation.

À côté de ce type de contrôle régional, il existe aussi des contrôles internationaux qui ont pour avantage de noter et classer les participants.

Le but de l'ensemble de ces contrôles est la maîtrise de la reproductibilité des techniques et l'uniformisation des résultats. On connaît en effet les problèmes de standardisation que rencontre, par exemple, l'enzymologie clinique (cf. chapitre 10).

6. *GBEA, certification, accréditation*

6.1. Guide de bonne exécution des analyses

Poussé par les démarches des pays anglo-saxons, le gouvernement français a publié en 1994 *un Guide de bonne exécution des analyses* (GBEA) destiné à créer des conditions de fonctionnement des laboratoires d'analyses médicales telles que la qualité est définie, étudiée et assurée. Ce guide, rendant obligatoire la mise en place d'un système Qualité, a été remis à jour en décembre 1999.

Voici les différents chapitres de ce document fondamental qui régit l'ensemble du fonctionnement des laboratoires de biologie clinique publics ou privés :

- 1 Introduction,
Objet, Définition des termes,
- II Règles de fonctionnement

Organisation, Installation, Instrumentation, Matériels et réactifs. Informatique, Elimination des déchets.

- III Exécution des analyses. Règles générales

Procédures et modes opératoires, Prélèvements, identification, conservation et élimination des échantillons. Validation des résultats. Expression des résultats et comptes rendus d'analyses. Transmission des résultats.

- IV Cas particuliers des examens de laboratoire destinés aux recherches biomédicales (protocoles d'essais cliniques de médicaments nouveaux) et des examens utilisant les techniques de biologie moléculaire.
- V L'assurance de Qualité

Responsabilité de la personne chargée de l'assurance qualité, l'Évaluation externe de la qualité, Contrôle de qualité interne.

- VI Stockage et Conservation des archives.
- Annexe A : Règles d'organisation et de fonctionnement pour les laboratoires de statut privé :

Forme d'exploitation et autorisation d'ouverture, Locaux, Signalisation, Equipement, Personnel, Transmission des prélèvements aux fins d'analyse, Tarifs applicables.

- **Annexe B :** Fiche de suivi médical.
- Annexe C : Durée et température de conservation des échantillons biologiques.

6.2. Certification

C'est l'existence d'un système d'assurance qualité, répondant aux normes internationales ISO 9000. Ces normes, datant de 1994 sont en cours de révision, les nouvelles étant prévues pour fin 2000.

La certification, reconnaissance d'une conformité, est délivrée par des organismes habilités, leur habilitation étant reconnue par le COFRAC qui est capable de les accréditer.

6.3. Accréditation

Lorsque, à la suite d'audits, la démonstration de la compétence et de la maîtrise du processus qualité mis en place est faite, l'accréditation peut être alors délivrée.

Elle impliquera une reconnaissance de compétence en matière d'organisation du laboratoire ainsi qu'en matière de qualité technique.

L'organisme habilité par les instances européennes est en France le COFRAC, Comité français d'Accréditation, qui s'appuie sur les normes européennes EN 45001, et qui a mis en place une commission spécialisée pour la

Biologie médicale. Les auditeurs qualiticiens sont accompagnés **d'auditeurs** techniques, compétents en matière de laboratoire d'analyses médicales.

Alors que le GBEA est obligatoire, certification et/ou accréditation sont des démarches volontaires.

Références bibliographiques

Annales du contrôle de qualité national. *Guide pour l'utilisation des résultats du contrôle de qualité en Biochimie. Laboratoire National de la Santé (Ministère de la Santé),* Paris, 1980.

A. Vassault, *Procédures d'assurance de qualité dans le traitement des analyses : critères d'évaluation. L'Assurance de Qualité en Biologie, XXXI' Dimanches Biologiques de Lariboisière,* Paris, 1991.

R. Dybkaer et P. Metais, *Nomenclature en chimie clinique. Recommandations internationales concernant les quantités, unités et les résultats de laboratoire,* Ann. biol. clin., 1972,30,99.

Protocole de validation de techniques. *Commission « Validation de techniques » de la Société Française de Biologie Clinique. Information scientif. Biologiste,* 1985, 11, 31.

GBEA, *Journal officiel de la République française,* 11 décembre 1999.

Accréditation par le COFRAC, www.cofrac.fr

Index



Achevé d'imprimer par Corlet, Imprimeur, S.A. -14110 Condé-sur-Noireau (France)
N° 415 - LK 80° - N° d'Imprimeur : 51134 - Dépôt légal : novembre 2000 - *Imprimé en U.E.*

Biochimie clinique

La médecine s'appuie de plus en plus sur les examens paracliniques d'imagerie et de biologie multidisciplinaire. Le médecin prescripteur doit donc interpréter les résultats des dosages biochimiques transmis par le laboratoire de biologie médicale en fonction des autres données recueillies auprès du patient.

Les connaissances élémentaires de biochimie, de séméiologie et de chimie analytique rassemblées dans ce classique sont nécessaires non seulement aux médecins ou aux pharmaciens biologistes, mais aussi aux techniciens des laboratoires pratiquant ces analyses, ainsi qu'aux médecins en exercice ou en formation.

Biochimie clinique se focalise volontairement sur des sujets classiques et des problèmes de pratique quotidienne. Chaque chapitre étudie les notions physiologiques élémentaires, les moyens d'exploration, les applications pathologiques usuelles et l'approche technologique.

Pierre Valdiguié est professeur de biochimie médicale à la faculté de médecine de Toulouse-Rangueil (université Paul-Sabatier). Médecin biologiste des hôpitaux de Toulouse, il dirige le service de biochimie de l'hôpital universitaire de Rangueil.

